

**UNIVERSITÉ MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER II

École Doctorale : Sciences des procédés – Sciences des aliments

Discipline : Biochimie, chimie et technologie des aliments

Présentée et soutenue publiquement

Par

Mickaël Laguerre

le mardi 9 décembre 2008

Titre :

**Bases moléculaires de la capacité antioxydante de composés phénoliques :
étude en milieux homogène, émulsionné et cellulaire**

JURY

**Olivier DANGLES
Claude GENOT
Michel LINDER
Pierre VILLENEUVE
Gérard CABELLO
Elisée FERRÉ
Valérie LULLIEN-PELLERIN**

**Université Avignon
INRA, UR1268, Nantes
ENSAIA-INPL, Nancy
CIRAD, UMR 62 Montpellier
INRA UMR 866, Montpellier
Université Aix-Marseille III
INRA, UMR 1208**

**Président
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse
Co-Directeur de thèse
Examineur
Invitée**

Travaux relatifs à cette étude

Publications

Laguerre M, López Giraldo LJ, Lecomte J, Villeneuve P. Comparative structure-activity relationships of phenolic antioxidants by DPPH, ORAC, and CAT assays. *En préparation pour Anal Chim Acta.*

López Giraldo LJ, Laguerre M, Lecomte J, Figueroa-Espinoza MC, Baréa B, Weiss J, Decker EA, Villeneuve P. Antioxidant capacity evaluation of rosmarinic acid and its alkyl esters by the conjugated autoxidizable triene (CAT) assay : Focus on a cut-off influence of the alkyl chain length. *En préparation pour Chem Phys Lipids.*

López Giraldo LJ, Laguerre M, Lecomte J, Figueroa-Espinoza MC, Baréa B, Weiss J, Decker EA, Villeneuve P. Antioxidant capacity evaluation of chlorogenic acid and its alkyl esters by the conjugated autoxidizable triene (CAT) assay : Focus on a cut-off influence of the alkyl chain length. *En préparation pour Chem Phys Lipids.*

López Giraldo LJ, Laguerre M, Villeneuve P, Baréa B, Lecomte J. Synthesis and free radical scavenging properties of rosmarinic acid fatty esters. *Soumise à Tetrahedron Letter.*

Laguerre M, López Giraldo LJ, Piombo G, Combe A, Rossignol Castéra A, Lecomte J, Villeneuve P. Characterization of olive leaf phenolics by electrospray ionization mass spectrometry and evaluation of their antioxidant capacities by the conjugated autoxidizable triene (CAT) assay. *Soumise à J Am Oil Chem Soc.*

Laguerre M, López Giraldo LJ, Lecomte J, Villeneuve P. Widespread methods and new analytical approaches in antioxidant evaluation. *Inform 2009, sous presse.*

López Giraldo LJ, Laguerre M, Lecomte J, Figueroa-Espinoza MC, Baréa B, Weiss J, Decker EA, Villeneuve P. Kinetic and stoichiometry of the reaction of chlorogenic acid and its alkyl esters against the DPPH radical. *J Agric Food Chem 2009, 57, 863-870.*

Laguerre M, López-Giraldo LJ, Lecomte J, Baréa B, Cambon E, Tchobo PF, Barouh N, Villeneuve P. Conjugated autoxidizable triene (CAT) assay: a novel spectrophotometric method for determination of antioxidant capacity using triacylglycerol as ultraviolet probe. *Anal Biochem 2008, 380, 282-290.*

Laguerre M, López Giraldo LJ, Lecomte J, Pina M, Villeneuve P. Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante. *Ol Corps Gras Lipides 2007, 14, 278-292.*

Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Prog Lipid Res 2007, 46, 244-282.*

López Giraldo LJ, Laguerre M, Lecomte J, Figueroa-Espinoza MC, Barouh N, Baréa B, Villeneuve P. Lipase-catalysed synthesis of chlorogenate fatty esters in solvent-free medium. *Enz Microb Tech 2007, 41, 721-726.*

López Giraldo LJ, Laguerre M, Lecomte J, Figueroa-Espinoza MC, Pina M, Villeneuve P. Lipophilisation enzymatique de composés phénoliques et propriétés antioxydantes des molécules lipophilisées. *Ol Corps Gras Lipides 2007, 14, 51-59.*

Communications orales à des congrès internationaux

Laguerre M, López-Giraldo LJ, Lecomte J, Chabi B, Wrutniak-Cabello C, Cabello G, Villeneuve P. Molecular basis of the phenolics antioxidant capacity: study in homogeneous, emulsified and cellular media. *Soumise au World Congress on Oils and Fats & 28th ISF Congress, 27-30 Septembre 2009, Sydney, Australia.*

López-Giraldo LJ, Laguerre M, Lecomte J, Figueroa-Espinoza MC, Weiss J, Decker EA, Wrutniak-Cabello C, Cabello G, Villeneuve P. Lipophilization of phenolic acids and its impact on their antioxidant properties in emulsified and cellular media. *100th AOCS Annual Meeting & Expo, 3-6 Mai 2009, Orlando, USA.*

Laguerre M, López Giraldo LJ, Lecomte J, Villeneuve P. **2008 AOCS Honored Student Award Lecture:** What are the main physicochemical factors involved in antioxidant action of phenolics to counteract lipid oxidation ? A new approach through the conjugated triene assay. *99th AOCS Annual Meeting & Expo, 18-21 Mai 2008, Seattle, USA.*

López-Giraldo LJ, Laguerre M, Lecomte J, Figueroa-Espinoza MC, Villeneuve P. Enzymatic hydrophobation of phenolic compounds: insight upon their antioxidant protection effect. *99th AOCS Annual Meeting & Expo, 18-21 Mai 2008, Seattle, USA.*

Laguerre M, Lecomte J, López-Giraldo LJ, Figueroa-Espinoza MC, Villeneuve P. New spectrophotometric determination of antioxidant capacity using conjugated triene triacylglycerols naturally present in Tung oil. *5th EuroFed Lipid Congress, 16-19 Septembre 2007, Gothenburg, Sweden.*

Figueroa-Espinoza MC, López-Giraldo LJ, Baréa B, Laguerre M, Lopez-Mendez EM, Gonzalez-Rios O, Suarez-Quiroz M, Pina M, Villeneuve P. Enzymatic hydrophobation of phenolic compounds and their properties as antioxidant and antimicrobial agents. *4th EuroFed Lipid Congress, 1-4 Octobre 2006, Madrid, Spain.*

Communications affichées à des congrès internationaux

Laguerre M, López Giraldo LJ, Piombo G, Combe A, Rossignol Castera A, Pina M, Figueroa Espinoza MC, Lecomte J, Villeneuve P. Measurement of antioxidant capacity of olive leaf flavonoids and secoiridoids by the use of a conjugated triene assay. *6th EuroFed Lipid Congress, 7-10 Septembre 2008, Athens, Greece.*

López Giraldo LJ, Laguerre M, Lecomte J, Figueroa Espinoza MC, Weiss J, Decker EA, Hiromi Y, Villeneuve P. Free radical scavenging capacity of chlorogenate esters: a quantitative structure-activity relationships study. *5th EuroFed Lipid Congress, 16-19 Septembre 2007, Gothenburg, Sweden.*

López Giraldo LJ, Laguerre M, Cambon E, Figueroa Espinoza MC, Pina M, Villeneuve P. Synthesis of multifunctional molecules by enzymatic lipophilization of chlorogenic acid. *4th EuroFed Lipid Congress, 1-4 Octobre 2006, Madrid, Spain.*

Remerciements

Mes remerciements vont en premier lieu au Dr Pierre Villeneuve pour m'avoir accordé sa confiance et accueilli au sein de son équipe. J'ai passé trois années formidables sous ta direction. Merci de m'avoir encadré, soutenu dans les moments difficiles et dirigé avec tant de compétence et de gentillesse. Tu as fait énormément pour cette thèse, et j'espère que ces quelques mots sauront t'exprimer ma reconnaissance et mon amitié.

Je tiens également à exprimer ma sincère gratitude au Dr Gérard Cabello qui a codirigé cette thèse, pour son investissement, sa sympathie et la célérité dont il fait preuve pour interpréter les résultats.

J'adresse ma plus respectueuse reconnaissance au Dr Claude Genot et au Pr. Michel Linder pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et pour le temps consacré à l'examen de ce mémoire. Les suggestions pertinentes qu'ils ont faites sur ce travail de thèse ont contribué à améliorer le manuscrit final.

Je veux également remercier sincèrement le Dr Valérie Lullien-Pellerin, le Dr Elisée Ferré et le Pr. Olivier Dangles pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail et d'avoir participé à ce jury. Je souhaite remercier deux interlocuteurs privilégiés que j'ai eus la chance de rencontrer durant ces trois années de thèse. Le Dr Jérôme Lecomte au CIRAD qui, en plus de sa rigueur scientifique et de son analyse critique approfondie - permettant souvent de préciser des aspects scientifiques difficiles à cerner - a donné de sa personne bien au-delà de ce à quoi sa fonction d'encadrant l'obligeait. Que le Dr Chantal Cabello à l'INRA trouve également l'expression de ma profonde gratitude pour les conseils qu'elle m'a prodigués, les pistes de recherche que nos discussions ont engendrées et pour m'avoir inculqué avec patience et pédagogie les bases de la culture cellulaire.

Je tiens également à remercier le Pr. Jean-Marie Navarro pour m'avoir orienté sur cette thématique et pour avoir priorisé mes intérêts. Je sais quelle dette j'ai envers lui. Ces remerciements seraient incomplets, sans exprimer ma reconnaissance au Pr. Stéphane Guilbert dont l'initiative est à l'origine de ce beau projet de thèse associant la chimie et la biologie.

Un grand merci à « l'équipe du Cirad », Maria-Cruz Figuéroa Espinoza, Nathalie Barouh, Michel Pina et Bruno Baréa pour leur aide au laboratoire et leurs conseils avisés. La présentation de ce manuscrit doit beaucoup au soin et à la diligence de Clara Lachgar qui s'est également occupée de l'aspect rébarbatif de la thèse : à savoir les papiers ! Je souhaite enfin remercier Georges Piombo pour avoir apporté son expérience et sa bonne humeur au laboratoire.

Un autre grand merci à « l'équipe INRA », et plus particulièrement à Béatrice Chabi pour m'avoir initié à l'utilisation des sondes fluorogéniques mais également à Vincent Ollendorff pour m'avoir tout dernièrement ouvert l'esprit sur l'implication de l'organisation micellaire dans le processus d'internalisation cellulaire.

Merci à la Région Languedoc-Roussillon et au CIRAD pour m'avoir attribué une bourse pour ces trois années de thèse. Je souhaite également exprimer ma reconnaissance à l'American Oil Chemists' Society (AOCS) et plus particulièrement à Doug Bibus pour m'avoir décerné un « Honored Student Award » (un 24 Décembre, pour peu je me serais cru à Noël) et m'avoir ainsi permis de présenter mes travaux à Seattle lors du congrès annuel de l'AOCS.

Que les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse trouvent ici le témoignage de ma gratitude (ainsi, je suis sûr de n'oublier personne).

Je remercie du fond du coeur les doctorants et les stagiaires qui ont croisé mon chemin, ceux qui ont cohabité dans notre bureau. J'ai une pensée amicale pour Manue...euh pardon pour le Dr Emmanuelle Cambon qui a été mon meilleur public durant ces années de thèse, et pour le futur président béninois Paul Fidèle Tchobo alias « tu dis ? » avec qui j'ai partagé des moments inoubliables. J'ai eu l'immense plaisir de côtoyer au Cirad des gens de toutes

cultures, tous horizons, toutes origines ce qui m'a appris énormément et m'a parfois amené à changer de point de vue. Il s'agit d'une hygiène intellectuelle indispensable.

Merci à Marlène pour sa bonne humeur permanente et son sens de l'initiative, à Aurélia pour être allée à Lattes en roller pour me dire au revoir (par deux fois !), à Catherine pour sa générosité et sa gentillesse, à Thais pour l'exotisme qu'elle a su apporter dans le bureau, à Joseph pour son rire communicatif, à Améziane (dont je n'ai jamais su orthographier le prénom) pour sa grande philosophie, à Privat pour ses analyses expertes en géopolitique, à François pour ses histoires de décapitation de souris au massicot (à des fins scientifiques s'entend), à Yuna pour les conversations dépayssantes sur les sorciers béninois, à Souad pour sa franchise et ses prises de position, à Bertrand pour ses nombreuses histoires de Suédoises, à Maiken pour ses bonbons au chlorure d'ammonium délicatement dissimulés dans mon café (avec la malveillante complicité de personnes citées dans ces remerciements : ma vengeance sera terrible !), à Frank pour son imperturbable sérénité, très utile en temps de crise et enfin à Claire dont le talent n'a d'égal que sa gentillesse et sa spontanéité.

Je remercie également Isabelle sans qui ces années de thèse n'auraient pas eu la même allure. Elle a été un soutien inestimable à Luis et à moi, quitte à nous mater parfois (Mickaël, as-tu tous tes papiers et ton annexe B ?). Elle a été un allier de poids pour lutter contre ma tendance naturelle à la procrastination. Merci du fond du cœur.

Muchas gracias à Luis alias « Loulou », mon compagnon de galère pendant trois ans, avec qui la symbiose scientifique a fonctionné à merveille, avec qui l'émulation a permis de nous motiver, de tenir et de nous soutenir mutuellement. Après un tel chemin ensemble, la séparation va être difficile : à qui vas-tu demander « vienes a beber un cafe ? », à George Clooney peut-être, « what else » ?

Merci également aux stagiaires qui ont apporté une précieuse contribution à cette thèse, notamment Valentine qui pourra clamer mieux que personne connaître la vraie signification des méthodes stakhanovistes, et Marjorie qui a travaillé avec l'entité bicéphale Loulou-Mimi sur l'affreuse méthode CAT. Elles ont été les soldats de l'ombre de cette thèse.

Une pensée à mes amis que j'apprécie tant et que je n'appelle pas assez mais avec qui les rapports restent intacts malgré l'éloignement ou les silences radio de plusieurs mois. Admettons ici que la distance ne change pas grand-chose à la force des relations.

À Pascaline et Ben alias « Saint Igor » (Dis, tu pourras encore me prêter la télécommande de ton Mac?),

À Rémi et Florence (Félicitations aux jeunes mariés ! Rémi, le seul marin en déficit à acheter une voiture et un bateau, la croissance peut te remercier),

À Lionel (Le jardinier parisien le plus coool et ami de longue date)...

En voilà de belles amitiés qui perdurent malgré les distances (Bon, je te l'accorde Ben, on habite à côté, mais personne ne le sait à part nous).

Enfin, les derniers mais pas les moindres: Merci à ma famille.

Tout d'abord, je tiens à remercier ma future femme, Jessica alias « princesse indienne » qui a été de tous les combats. Tu es la plus belle découverte que j'ai réalisée dans ma carrière de jeune chercheur : un éclat de pur diamant.

Un grand merci enfin à ma grande sœur Magali, à mon beau-frère Sébastien (dommage que nos modes de vie décalés ne s'accordent pas au mieux pour se voir plus souvent), à mon neveu Fabien (grâce à toi et tes précieux renseignements sur la tectonique, je parais un peu moins ringard), à mon petit frère Anthony (la rock star d'Annecy), sans oublier la dernière recrue de la famille, Caroline (tu n'a pas fini d'entendre parler de tarte tatin) et surtout mes parents pour leur soutien inestimable et pour ne s'être jamais plaints : je ne vous remercierai jamais assez. C'est un sacré plaisir de vous avoir dans les alentours.

À ma mère

Table des matières

Travaux relatifs à l'étude

Remerciements

Liste des abréviations

Avant propos et objectifs

| | |
|--|-----------|
| CHAPITRE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 16 |
| 1. ASPECTS CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DES MÉCANISMES OXYDATIFS | 17 |
| 1.1. GÉNÉRATION DES ESPÈCES OXYDANTES | 18 |
| 1.1.1. Les mitochondries : sources majeures d'espèces oxydantes..... | 18 |
| 1.1.2. Devenir métabolique des espèces oxydantes | 22 |
| 1.2. OXYDATION DES LIPIDES | 25 |
| 1.3. OXYDATION DES PROTÉINES..... | 31 |
| 1.4. OXYDATION DES ACIDES NUCLÉIQUES | 35 |
| 2. ANTIOXYDANTS | 40 |
| 2.1. MODES D'ACTION DES ANTIOXYDANTS | 40 |
| 2.1.1. Détoxification endogène enzymatique des EROs | 40 |
| 2.1.2. Substances antiradicalaires non enzymatiques | 43 |
| 2.1.2.1. Origine et structure chimique | 44 |
| 2.1.2.2. Aspects mécanistiques et cinétiques..... | 49 |
| 2.1.3. Piégeurs d'oxygène singulet..... | 53 |
| 2.1.4. Chélateurs de métaux de transition..... | 55 |
| 2.1.5. Effets pro-oxydants | 56 |
| 2.2. EFFETS SYNERGIQUES, ANTAGONISTES ET ADDITIFS..... | 57 |
| 2.2.1. Combinaison d' α -tocophérol et d'acide ascorbique..... | 58 |
| 2.2.2. Combinaisons d' α -tocophérol et de composés phénoliques..... | 61 |
| 3. MÉTHODES D'ÉVALUATION IN VITRO DE LA CAPACITÉ ANTIOXYDANTE | 64 |
| 3.1. MÉTHODES NON COMPÉTITIVES..... | 64 |
| 3.1.1. Le test au radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl | 64 |
| 3.1.2. Radical cation dérivé de l'acide 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique | 67 |
| 3.2. MÉTHODES COMPÉTITIVES | 69 |
| 3.2.1. Déplétion en oxygène..... | 69 |
| 3.2.2. Disparition du substrat | 71 |
| 3.2.2.1. Méthodes utilisant la β -phycoérythrine..... | 71 |
| 3.2.2.2. Méthode utilisant la fluorescéine (ORAC _{FL})..... | 72 |
| 3.2.2.3. Co-oxydation du β -carotène et de l'acide linoléique | 75 |
| 3.2.2.4. Chute de fluorescence de l'acide cis-parinarique..... | 75 |
| 3.2.2.5. Cytométrie de flux et fluorescéines lipophilisées | 77 |
| 3.2.2.6. Chute de fluorescence du BODIPY..... | 79 |
| 3.2.3. Apparition de produits d'oxydation | 80 |
| 3.2.3.1. Mesure des hydroperoxydes | 81 |
| 3.2.3.2. Mesure spectrophotométrique des diènes conjugués..... | 82 |
| 3.2.3.3. Test à l'acide thiobarbiturique (TBA)..... | 84 |
| 3.2.3.4. Mesure des composés volatils par chromatographie..... | 85 |
| 3.2.3.5. Mesure des lipofuscines | 88 |
| 3.2.3.6. Mesure des produits d'oxydation de sondes cellulaires fluorogéniques..... | 89 |

| | |
|--|------------|
| CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES | 93 |
| 1. PRODUITS CHIMIQUES | 94 |
| 2. MESURE DE LA CAPACITÉ ANTIOXYDANTE DE COMPOSÉS Purs OU D'EXTRAITS VÉGÉTAUX..... | 95 |
| 2.1. Préparation des extraits de feuilles d'olivier | 95 |
| 2.2. Caractérisation des extraits de feuilles d'olivier par HPLC/MS-ESI..... | 96 |
| 2.3. Caractérisation de l'huile de tung..... | 97 |
| 2.3.1. Préparation des esters méthyliques d'huile de tung | 97 |
| 2.3.2. Caractérisation des triacylglycérols de l'huile de tung par HPLC..... | 97 |
| 2.3.3. Caractérisation de la répartition de l'huile de tung..... | 98 |
| 2.3.4. Analyses des tocophérols endogènes de l'huile de tung | 99 |
| 2.3.5. Préparation de l'huile de tung purifiée | 99 |
| 2.4. Protocole du test des triènes conjugués | 100 |
| 2.5. Mesure de la capacité antioxydante par la méthode DPPH | 102 |
| 2.6. Mesure de la capacité antioxydante par la méthode ORAC _{FL} | 105 |
| 2.7. détermination théorique du <i>log D</i> | 106 |
| 3. TESTS SUR CULTURES CELLULAIRES | 107 |
| 3.1. Cellules employées et conditions de culture | 107 |
| 3.2. Préparation des cultures cellulaires en microplaque 96 puits..... | 107 |
| 3.3. Traitements avec les composés phénoliques | 107 |
| 3.4. Mesure de la capacité antioxydante de l'acide 5-caféoylquinique et de ses esters alkyliques | 108 |
| 3.4.1. Synthèse des esters alkyliques d'acide 5-caféoylquinique | 108 |
| 3.4.2. Identification des esters alkyliques d'acide 5-caféoylquinique | 109 |
| 3.4.3. Mesure des espèces oxydantes par la 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine-diacétate..... | 109 |
| 3.4.4. Quantification de l'ADN par le réactif de Hoechst 33258 | 111 |
| 3.5. Mesure de la cytotoxicité de l'acide 5-caféoylquinique et de ses esters alkyliques | 112 |
| CHAPITRE 3 : RÉSULTATS ET DISCUSSION..... | 114 |
| 1. DÉVELOPPEMENT, VALIDATION ET APPLICATION DE LA MÉTHODE CAT ... | 116 |
| 1.1. MÉTHODOLOGIE ET OPTIMISATION DES CONDITIONS OPÉRATOIRES | 118 |
| 1.1.1. Choix du système et de la stratégie de mesure de l'oxydation | 118 |
| 1.1.2. Choix du substrat oxydable..... | 118 |
| 1.1.3. Propriétés chimiques de l'huile de tung | 120 |
| 1.1.4. Propriétés spectrales de l'huile de tung..... | 122 |
| 1.1.5. Préparation de l'émulsion | 124 |
| 1.1.6. Oxydation artificielle de l'huile de tung en émulsion..... | 128 |
| 1.2. MESURE DE LA CAPACITÉ ANTIOXYDANTE DE COMPOSÉS PHÉNOLIQUES | 133 |
| 1.2.1. Aspects cinétiques..... | 134 |
| 1.2.2. Expression des résultats..... | 138 |
| 1.3. CONCLUSION | 140 |
| 2. ÉTUDE DE LA RELATION STRUCTURE-ACTIVITÉ DE COMPOSÉS PHÉNOLIQUES SIMPLES | 142 |
| 2.1. MÉTHODE CAT | 144 |
| 2.1.1. Analyse globale | 144 |
| 2.1.2. Étude spécifique des acides phénoliques | 146 |
| 2.1.3. Étude spécifique des flavonoïdes..... | 148 |
| 2.2. MÉTHODE ORAC _{FL} | 151 |

| | |
|--|-----|
| 2.2.1. Analyse globale | 152 |
| 2.2.2. Étude spécifique des acides phénoliques | 153 |
| 2.2.3. Étude spécifique des flavonoïdes..... | 154 |
| 2.3. MÉTHODE DPPH | 156 |
| 2.3.1. Analyse globale | 157 |
| 2.3.2. Étude spécifique des flavonoïdes..... | 157 |
| 2.3.3. Étude spécifique des acides phénoliques | 159 |
| 2.3.4. Étude stœchiométrique | 160 |
| 2.4. CONCLUSION | 167 |
| 3. APPLICATION DU TEST CAT À L'ÉTUDE D'EXTRAITS VÉGÉTAUX : FEUILLES D'OLIVIER..... | 169 |
| 3.1. CARACTÉRISATION DU PROFIL PHÉNOLIQUE..... | 171 |
| 3.2. ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION DU PROFIL PHÉNOLIQUE..... | 176 |
| 3.3. ÉTUDE DE LA CAPACITÉ ANTIOXYDANTE DES EXTRAITS DE FEUILLES | 180 |
| 3.4. CONCLUSION | 183 |
| 4. ÉTUDE DE LA CAPACITÉ ANTIOXYDANTE SUR CULTURES CELLULAIRES .. | 185 |
| 4.1. CHOIX DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES | 188 |
| 4.2. ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS ANTIOXYDANTES DE COMPOSÉS PHÉNOLIQUES | 190 |
| 4.3. ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS ANTIOXYDANTES EN SYSTEMES ACELLULAIRES | 199 |
| 4.4. ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS CYTOTOXIQUES..... | 202 |
| 4.5. CONCLUSION | 206 |
| CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES..... | 207 |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 213 |

Liste des abréviations

| | |
|-------------------------------------|--|
| AA | Acide aminé |
| AAPH | 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochlorhydrique |
| ABTS | Acide 2,2-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique |
| ABTS⁺ | Radical cation de l'acide 2,2-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique |
| AcOEt | Acétate d'éthyle |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADNm | Acide désoxyribonucléique mitochondrial |
| ADP | Adénosine diphosphate |
| AG | Acide gras |
| AGI | Acide gras insaturé |
| AGL | Acide gras libre |
| AGPI | Acide gras polyinsaturé |
| ALE | Produit de lipoxydation avancée |
| AMVN | 2,2'-azobis(2,4-diméthylvaléronitrile) |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| AUC | Aire sous la courbe |
| BDE | Bond dissociation energy (énergie de dissociation homolytique) |
| BER | Réparation par excision de bases |
| BHA | Butylhydroxyanisol |
| BHT | Butylhydroxytoluène |
| β-PE | β -phycoérythrine |
| Cat | Catalase |
| CAT | Conjugated autoxidizable triene (triène autoxydable conjugué) |
| C11-fluor | 5-(N-dodécanoyl)aminofluorescéine |
| C16-fluor | 5-hexadécanoylaminofluorescéine |
| C18-fluor | 5-octadécanoylaminofluorescéine |
| C11-BODIPY^{581/591} | acide 4,4-difluoro-5-(4-phényl-1,3-butadiényle)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène-3-undécanoïque |
| CCM | Chromatographie en couche mince |
| CH₂Cl₂ | Dichlorométhane |
| CMC | Concentration micellaire critique |
| CO₃^{•-} | Radical carbonate |
| CoA | Coenzyme A |
| CPG-SM | Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse |
| c-PnA | Acide <i>cis</i> -parinarique ou octadécatétraénoïque |
| 5-CQA | Acide 5-caféoylquinique |
| DCHF₂ | 2',7'-Dichlorodihydrofluorescéine |
| DCHF₂-DA | 2',7'-Dichlorodihydrofluorescéine-diacétate |
| DHA | Acide docosahexaénoïque |
| DHS | Espace de tête dynamique |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's medium |
| DPPH-H | 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine |
| DPPH[•] | Radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl |
| DPPH⁻ | Anion 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl |
| E⁰ | Potentiel d'oxydo-réduction |
| EC₅₀ | Quantité d'antioxydant nécessaire à la réduction de 50 % du signal initial |
| EDS | Extraction/distillation simultanée |

| | |
|-----------------------------------|---|
| EDTA | Acide éthylènediamine-tétracétique |
| EPA | Acide eicosapentaénoïque |
| ERN | Espèce réactive de l'azote |
| ERO | Espèce réactive de l'oxygène |
| ESI | Ionisation de type électro-nébulisation |
| ET | Équivalent Trolox |
| FAD | Flavine adénine dinucléotide réduite |
| FADH₂ | Flavine adénine dinucléotide réduite |
| Fe²⁺ | Ion ferreux |
| Fe³⁺ | Ion ferrique |
| fluor-DHPE | Dihexadécanoylglycérophosphoéthanolaminofluorescéine |
| FL | Fluorescéine |
| FRAP | Ferric reducing antioxidant power |
| GSH | Glutathion |
| GSH-Px | Glutathion peroxydase |
| GSH-Red | Glutathion réductase |
| HDE | 2-Hydroxy-4-décénal |
| HLB | Balance hydrophile/lipophile |
| 4-HNE | 4-Hydroxynonénal |
| HPLC | Chromatographie en phase liquide haute performance |
| H₂O₂ | Peroxyde d'hydrogène |
| HO[•] | Radical hydroxyle |
| HOCl | Acide hypochloreux |
| H-ORAC_{FL} | Oxygen radical absorbance capacity basée sur la fluorescéine et adaptée aux molécules hydrophiles |
| 15-HpETE | Acide 15-hydroperoxyeicosatétraénoïque |
| IP | Indice de peroxyde |
| L[•] | Radical lipidique centré sur le carbone |
| LC-MS | Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse |
| LDL | Lipoprotéine de basse densité |
| LDH | Lactate déshydrogénase |
| LH | Lipide insaturé |
| LOO[•] | Peroxyradical lipidique |
| LOO⁻ | Anion peroxyde |
| LOOH | Hydroperoxyde lipidique |
| L-ORAC_{FL} | Oxygen radical absorbance capacity basée sur la fluorescéine et adaptée aux molécules lipophiles |
| LOX | Lipoxygénase |
| MDA | Malondialdéhyde |
| Me | Métal de transition |
| MeO-AMVN | 2,2'-azobis(4-méthoxy-2,4-diméthylvaléronitrile) |
| MeOH | Méthanol |
| [M-H]- | Ion pseudo-moléculaire |
| MM | Masse moléculaire |
| N₃[•] | Radical azidyle |
| NAD | Nicotinamide adénine dinucléotide |
| NADH,H⁺ | Nicotinamide adénine dinucléotide réduite |
| NADP | Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate |
| NADPH₂ | Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite |
| NER | Réparation par excision de nucléotides |

| | |
|-----------------------------------|--|
| NO[•] | Monoxyde d'azote |
| NO₂[•] | Dioxyde d'azote |
| O₂^{•-} | Radical anion superoxyde |
| ¹O₂ | Oxygène singulet |
| ³O₂ | Oxygène triplet |
| ONOO⁻ | Peroxynitrite |
| ORAC_{β-PE} | Oxygen radical absorbance capacity basée sur la β-phycoérythrine |
| ORAC_{FL} | Oxygen radical absorbance capacity basée sur la fluorescéine |
| PBS | Solution de tampon phosphate |
| PE | Phosphatidyléthanolamine |
| PLPC | Palmito-linoléoyl phosphatidylcholine |
| R[•] | Radical centré sur le carbone |
| RMN | Résonnance magnétique nucléaire |
| ROO[•] | Peroxyradical |
| SHS | Espace de tête statique |
| SM | Spectrométrie de masse |
| SOD | Superoxyde dismutase |
| SPME | Micro-extraction en phase solide |
| PDA | Détecteur de type photodiode |
| TAG | Triacylglycérol |
| TBA | Acide 2-thiobarbiturique |
| TBARS | SubstanceS réactive à l'acide thiobarbiturique |
| TR | Temps de rétention |
| <i>t</i>-BuO[•] | Radical <i>tert</i> -butoxyle |
| TEAC | Trolox equivalent antioxidant capacity |
| Trx-Px | Thiorédoxine peroxydase |
| Trx-Red | Thiorédoxine réductase |
| Trx-(SH)₂ | Thiorédoxine oxydée |
| Trx-S₂ | Thiorédoxine réduite |
| UV | Ultraviolet |

Avant propos et objectifs

Les espèces réactives de l'oxygène (EROs) et leur implication probable dans certaines physiopathologies humaines suscitent, depuis ces dernières décennies, un intérêt grandissant dans le domaine de la santé. Cet intérêt a vu le jour il y a une cinquantaine d'années, lorsque [Harman \(1956\)](#) émit l'hypothèse que le vieillissement serait en partie dû à une accumulation de dommages moléculaires et cellulaires provoqués par les EROs. Depuis lors, le stress oxydant, résultant d'un déséquilibre entre les systèmes antioxydants et la production d'oxydants comme les EROs, semble être lié à de nombreuses maladies plurifactorielles au premier rang desquelles figurent les cancers ([Kawanishi et al., 2002](#)), les maladies cardio-vasculaires ([Sachidanandame et al., 2005](#)) et l'inflammation ([Bodamyali et al., 2000](#)). Les mécanismes par lesquels ces pathologies se développent impliquent généralement l'altération oxydative de molécules d'importance physiologique comme les protéines, les lipides et les acides nucléiques, ainsi que la modulation de l'expression des gènes et de la réponse inflammatoire.

Au cours de l'évolution, les organismes aérobies dont l'Homme se sont adaptés pour contrer les effets délétères du stress oxydant, notamment par la mise en place de systèmes de défense. Parmi eux, les systèmes enzymatiques, notamment les superoxyde dismutases, les catalases, les glutathion peroxydases ainsi que les systèmes thiorédoxines, sont reconnus comme étant les plus performants dans la détoxification des EROs. Les principaux systèmes antioxydants non enzymatiques présents dans l'organisme humain regroupent, quant à eux, le glutathion, la bilirubine, les hormones sexuelles œstrogéniques, l'acide urique, les formes ubiquinol/ubiquinone, et l'acide dihydrolipoïque. En outre, nombre d'études s'accordent aujourd'hui sur l'importance de la contribution des antioxydants exogènes, apportés notamment par l'alimentation, dans la lutte contre le stress oxydant. Ces antioxydants essentiellement d'origine végétale sont apportés sous la forme de composés phénoliques, de tocophérols, de tocotriénols, d'acide ascorbique et de caroténoïdes. Se pose alors la question de leur efficacité réelle et des outils nécessaires à leur évaluation, comme en témoignent les nombreuses revues consacrées à ce sujet ([Berset et Cuvelier, 1996](#) ; [Halliwell, 1990](#) ; [1995](#) ; [Prior et Cao, 1999](#) ; [Frankel et Meyer, 2000](#) ; [Ghiselli et al., 2000](#) ; [Niki et Noguchi, 2000](#) ; [Huang et al., 2005](#) ; [Prior et al., 2005](#) ; [Becker et al., 2004](#) ; [Antolovich et al., 2002](#) ; [Roginsky et Lissi, 2005](#) ; [Sánchez-Moreno, 2002](#) ; [Gomes et al., 2005](#) ; [Cuvelier et Peyrat-Maillard, 2007](#) ; [Frankel et Finley, 2008](#) ; [Magalhães et al., 2008](#)). Or, la complexité et

la diversité des systèmes d'étude ont conduit au développement d'une multitude de tests, aucun d'entre eux ne présentant malheureusement un caractère universel.

La stratégie de mesure la plus simple consiste à mesurer, en l'absence de substrat oxydable, la capacité d'une molécule à réduire un radical libre. Cette approche dite *non compétitive* est généralement facile à mettre en œuvre, mais présente l'inconvénient de ne pas fournir de mécanisme compétitif entre l'antioxydant et le substrat oxydable pour réduire les espèces oxydantes. À l'opposé de la stratégie *non-compétitive*, celle dite *compétitive* met en œuvre un substrat oxydable et consiste à mesurer l'effet inhibiteur d'une substance sur l'oxydation naturelle ou artificielle de ce substrat. Globalement, les tests peuvent être conduits (i) en milieux homogènes aqueux ou lipidiques, (ii) en milieux hétérogènes émulsifiés ou liposomiaux, ou encore (iii) en milieux naturels pluri-compartmentés comme les cellules en culture *in vitro*. D'un point de vue cinétique, deux approches peuvent être employées : (i) la mesure de la formation de produits d'oxydation ou (ii) la mesure de la disparition du substrat oxydable.

(i) Bien que les méthodes compétitives basées sur la mesure des produits d'oxydation présentent de nombreux avantages, elles sont néanmoins limitées par le fait qu'il n'existe pas de marqueur d'oxydation universel. Ainsi, dans le cas spécifique des lipides polyinsaturés, l'oxydation conduit à la formation de produits d'oxydation primaire, qui sont ensuite convertis en composés d'oxydation secondaire, lesquels peuvent encore réagir avec d'autres substrats oxydables comme les protéines ou l'ADN. Dans ce contexte, un produit d'oxydation peut être considéré comme un nœud d'un réseau dynamique de réactions complexes, subissant des influences en amont et en aval.

(ii) À l'opposé, l'autre approche cinétique se base sur la mesure de la disparition du substrat. Parmi ces méthodes, certaines ont été critiquées pour mettre en œuvre un très large excès d'antioxydant comparé au substrat oxydable, ce qui est irréaliste au regard du phénomène naturel d'antioxydation. D'autre part, les substrats oxydables utilisés dans ce type d'approche doivent être facilement mesurables, généralement au moyen d'une mesure spectrale. Cette limitation a conduit à l'utilisation de substrats fluorophores ou chromophores, qui sont toutefois non représentatifs des substrats rencontrés dans les aliments ou les milieux biologiques.

L'utilisation de ce corpus de méthodes a permis depuis une vingtaine d'années d'accumuler des données expérimentales relatives à la capacité antioxydante de molécules pures ou en mélange au sein d'extraits végétaux. Cependant, l'emploi de conditions opératoires et de

stratégies de mesure différentes a naturellement engendré des divergences de résultats et d'interprétation d'une étude à l'autre.

Au sein de cette problématique, le premier objectif de ce travail a été de mieux comprendre les propriétés d'une classe particulière de molécules antioxydantes comme les composés phénoliques. Atteindre cet objectif suppose cependant de disposer de systèmes de tests très variés mis en œuvre notamment en milieu homogène aqueux ou organique, en milieu hétérogène émulsifié et en milieu naturel compartimenté comme les cellules en culture.

Pour étudier les propriétés antioxydantes en milieu homogène aqueux, la méthode oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL}) basée sur l'utilisation de sel disodique de fluorescéine a été utilisée, tandis que pour travailler en milieu homogène organique la méthode non compétitive employant le radical stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) a été choisie. En revanche, pour les deux autres types de milieux, de nouvelles méthodologies ont été élaborées. Concernant les milieux hétérogènes de type émulsion, nous avons développé un test basé sur l'oxydation de triènes conjugués. Cette méthodologie se fonde sur les propriétés d'absorption dans le domaine ultraviolet de l'huile de tung en émulsion. L'utilisation de cette huile comme substrat oxydable a permis de mesurer la capacité antioxydante de différents composés phénoliques purs ou en mélange au sein d'extraits végétaux. Concernant les milieux naturels pluri-compartmentés, nous avons utilisé des lignées cellulaires de fibroblastes génétiquement modifiées, lesquelles sont caractérisées par une production endogène importante d'espèces oxydantes d'origine mitochondriale. Ce métabolisme cellulaire permet, entre autres avantages, de ne pas recourir à un mode d'induction artificielle de l'oxydation.

Le deuxième objectif de ce travail a été de caractériser les motifs structuraux impliqués dans le déterminisme de la capacité antioxydante sur la base des résultats expérimentaux obtenus dans les différents systèmes précédemment cités.

Pour cela différents modèles de composés phénoliques ont été employés. Dans un premier temps, l'étude a été focalisée sur des composés simples de type acides phénoliques et flavonoïdes, mais également sur des molécules phénoliques en mélange au sein d'extraits végétaux comme les extraits de feuilles d'olivier. Enfin, des molécules fonctionnalisées par greffage de chaînes aliphatiques de différentes longueurs ont été employées dans des systèmes hétérogènes de type émulsion et culture cellulaire. Parmi les différents paramètres physico-chimiques étudiés, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au nombre et à la position des hydroxyles phénoliques sur le cycle aromatique, à la possible modulation de

leur réactivité par la structure associée au(x) noyau(x) phénolique(s) (groupement à effet mésomère, ...), mais également à l'influence de l'hydrophobie des composés phénoliques modèles sur leurs propriétés antioxydantes.

Le présent manuscrit est structuré en trois chapitres.

Une synthèse bibliographique précède l'exposé des travaux et rappelle les principaux mécanismes d'oxydation et d'antioxydation, ainsi que les outils d'évaluation *in vitro* des propriétés antioxydantes. Au sein d'un deuxième chapitre intitulé « Matériel et méthodes », les modes opératoires des techniques employées sont détaillés.

Enfin, le troisième chapitre « Résultats et discussion » présente l'ensemble des résultats obtenus et les interprétations qui en découlent. Ce chapitre est structuré en quatre parties. La première présente la mise au point expérimentale et l'application de la méthodologie CAT (conjugated autoxidizable triene) à la détermination de la capacité antioxydante de composés phénoliques modèles. La deuxième partie concerne l'étude de la relation existant entre la structure moléculaire et la capacité antioxydante mesurée par trois méthodes *in vitro* : les tests ORAC_{FL}, DPPH et CAT. Une troisième section est ensuite consacrée à l'étude des propriétés antioxydantes d'extraits de feuilles d'olivier par l'intermédiaire de la méthode CAT. Enfin, sont détaillés dans la dernière partie les résultats obtenus sur culture cellulaire de fibroblastes humains.

CHAPITRE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. ASPECTS CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES DES MÉCANISMES OXYDATIFS

Au cours de l'évolution, les organismes aérobies se sont adaptés à l'oxygène atmosphérique par la mise en place de systèmes métabolisant l'oxygène. Élément indispensable à notre survie, l'oxygène est également à l'origine de toxicité chez l'Homme. Cette toxicité est liée à sa nature bi-radicalaire, autorisant des réarrangements électroniques sur la couche orbitale externe et le rendant plus actif. Ainsi, l'oxygène moléculaire peut se transformer dans les cellules mammifères, essentiellement par voie enzymatique, en espèces réactives de l'oxygène (EROs). Le complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire représente la principale source enzymatique d'EROs, bien que d'autres sources, cytosoliques, membranaires ou présentes au sein de différents organites cellulaires, puissent également générer des EROs : NADPH oxydase membranaire, xanthine-xanthine oxydase, enzymes de la voie de l'acide arachidonique (lipoxygénase, cyclo-oxygénase), enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochrome P₄₅₀) et peroxysomes (Beaudeux et Vasson, 2005). Notons qu'en parallèle, des EROs peuvent être formées de manière non-enzymatique, notamment au travers de l'autoxydation des catécholamines, des quinones et des flavines par l'intermédiaire de facteurs environnementaux tels que les UVs, les radiations ionisantes, les catalyseurs chimiques, l'alcool, le tabac, les médicaments, ainsi que les épisodes d'ischémie-reperfusion. Dans les conditions quotidiennes normales, ces EROs sont continuellement produites en faibles quantités et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans ces circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydant et/ou par suite d'une surproduction d'EROs, l'excès de ces espèces oxydantes est appelé « stress oxydant » et peut résulter en l'oxydation de substrats bio-organiques d'importance physiologique comme les lipides, les protéines et les acides nucléiques (Favier, 2003). Ainsi, dans les membranes, l'oxydation des lipides et la réaction des produits d'oxydation avec les protéines vont perturber la microarchitecture membranaire et altérer certaines fonctions biologiques cruciales telles que la perméabilité, la fluidité ou encore l'activité de récepteurs et d'enzymes (Cillard et Cillard, 2006). Dans les lipoprotéines de basse densité (LDL), l'oxydation des lipides, mais également la modification des résidus lysines de l'apolipoprotéine B100 par les produits d'oxydation lipidique secondaire, jouent un rôle majeur dans l'étiologie de l'athérosclérose. Les LDLs oxydés se comportent en effet comme de véritables « chevaux de Troie » en introduisant dans les macrophages des produits d'oxydation fluorescents et carbonylés qui participent, par le biais de mécanismes encore partiellement élucidés, à la

formation de cellules spumeuses et des stries lipidiques concomitantes. Par ailleurs, l'oxydation de résidus cystéines du domaine de liaison à l'ADN de la p53 (protéine « gardienne du génome »), peut conduire à une gêne stérique lors de son interaction avec l'ADN, altérant ainsi le processus de mort cellulaire programmée ainsi que la réparation de l'ADN. Au niveau nucléaire, les modifications oxydatives des bases de l'ADN sont des causes possibles de mutagenèse et de cancérogenèse.

Sur un autre plan, enfin, l'oxydation pose de sérieux problèmes aux industries agroalimentaires et cosmétiques, notamment celles utilisant des acides gras polyinsaturés. Ainsi, dans le domaine alimentaire et au-delà de l'altération des qualités gustatives (rancissement) et nutritionnelles (pertes en vitamines et acides gras essentiels), l'oxydation des lipides et des protéines en composés hautement réactifs et toxiques représente un danger réel pour le consommateur. Après un bref rappel théorique concernant la génération des espèces oxydantes, nous aborderons les mécanismes oxydatifs de trois grandes familles : les lipides, les protéines et les acides nucléiques.

1.1. GÉNÉRATION DES ESPÈCES OXYDANTES

Les espèces réactives de l'oxygène (EROs) peuvent être définies comme des espèces partiellement réduites de l'oxygène dont le chef de file est le radical superoxyde $O_2^{\bullet -}$ résultant de la réduction mono-électronique de l'oxygène en présence de métaux de transition, de molécules organiques, mais surtout d'enzymes appartenant pour la plupart au complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale.

1.1.1. Les mitochondries : sources majeures d'espèces oxydantes

Les mitochondries sont des organites cytoplasmiques présents dans toutes les cellules eucaryotes, dont la fonction la mieux caractérisée est la production d'énergie par phosphorylation oxydative. Le terme mitochondrie, donné par Benda en 1898, dérive du grec *mitos* signifiant « filament » et de *kondros* qui désigne la « graine », en raison de l'aspect de cet organite durant la spermatogénèse. Les mitochondries sont des organites de petite taille de l'ordre du micron (**Fig. 1A-C**). Leur nombre dans la cellule est encore sujet à débat (Collins *et al.*, 2002). À titre d'exemple, il a été estimé que les hépatocytes de rat contenaient de l'ordre de 1000 mitochondries par cellule, mais cette abondance dépend du type cellulaire. Les mitochondries présentent une ultra-structure standard avec un double système membranaire (2

doubles couches phospholipidiques) définissant deux compartiments mitochondriaux distincts : l'espace matriciel et l'espace intermembranaire (**Fig. 1**).

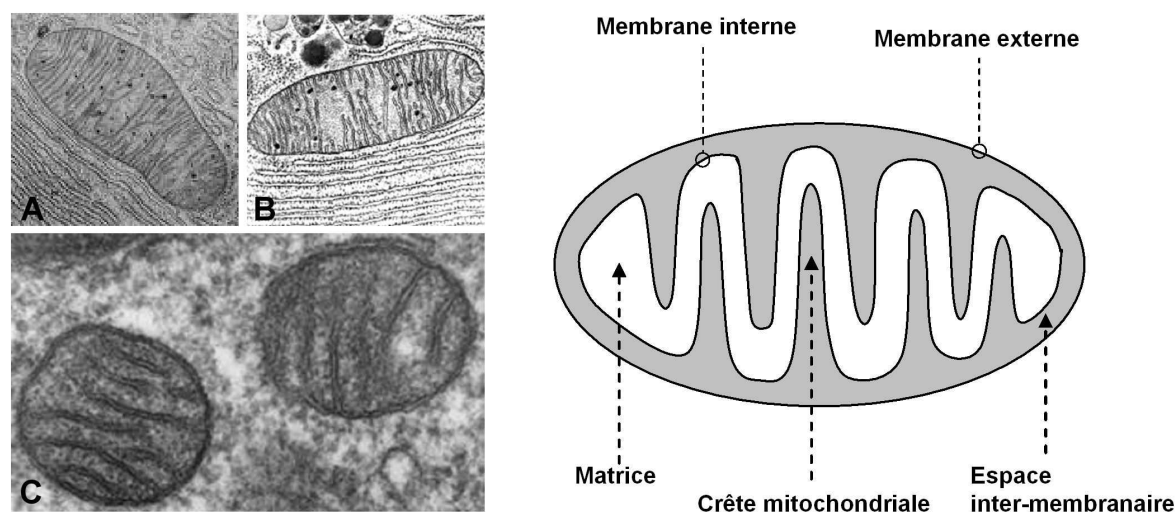


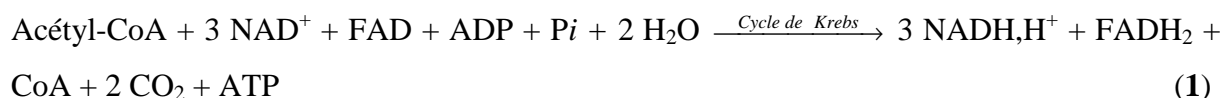
Fig. 1. Morphologie des mitochondries humaines.

La constitution de leur double membrane riche en cardiolipine, leur patrimoine génétique (absence d'intron et d'histone, codons différents), la structure des unités codées par l'ADN mitochondrial de la cytochrome *c* oxydase, leur mode de renouvellement par scissiparité (mitochondriodierèse), ainsi que la sensibilité similaire des ribosomes mitochondriaux et bactériens aux antibiotiques comme la streptomycine, suggèrent fortement que les mitochondries seraient les descendants directs de bactéries logées à l'intérieur d'un hôte bactérien dit nucléo-cytoplasmique selon la théorie endosymbiotique de [Portier \(1918\)](#). Par la suite, [Wallin \(1927\)](#) mais surtout [Margulis \(1967¹ ; 1970\)](#) ont étayé et formulé l'intuition initiale de Portier dans un cadre théorique plus formel en incorporant de nombreuses observations établies dans le champ de la microbiologie. Selon [Margulis et Sagan \(2002\)](#), l'un des scénarios endosymbiotiques les plus probables impliquerait que les mitochondries seraient apparues par endosymbiose de bactéries prédatrices ancestrales proches de *Bdellovibrio* ou *Daptobacter* avec une bactérie hôte de type *Thermoplasma*.

D'un point de vue fonctionnel, les mitochondries sont responsables de la production de l'énergie indispensable au travail cellulaire. L'énergie chimique utilisée par les cellules est principalement emmagasinée dans la dernière liaison phosphate de l'adénosine triphosphate (ATP). Cette molécule est obtenue par oxydation des combustibles cellulaires que constituent le glucose, les acides gras et les acides aminés. Ainsi, les voies cataboliques (β -oxydation ou

¹ Publié sous le nom d'épouse Sagan.

hélice de Lynen, glycolyse, voie des pentoses phosphates, ...) associées à ces différents nutriments convergent vers la molécule d'acétyl-CoA, qui va par la suite être prise en charge par le cycle des acides tricarboxyliques, également appelé cycle de Krebs. À l'issue de huit réactions successives, l'oxydation complète de l'acétyl-CoA en CO_2 s'accompagne de la production d'électrons qui vont être pris en charge par des coenzymes et des flavoprotéines (**réaction 1**).



Ainsi, l'oxydation complète des combustibles cellulaires permet la constitution d'un pool matriciel de coenzymes réduits (NADH, H^+) et de flavoprotéines réduites (FADH_2) donneurs d'électrons. Ces électrons sont ensuite transférés vers l'oxygène moléculaire par l'intermédiaire de quatre complexes enzymatiques constituant la chaîne de transport des électrons (ou chaîne respiratoire) localisée au niveau de la membrane interne mitochondriale (**Fig. 2**). Les coenzymes réduits cèdent leurs deux électrons à un système de transporteurs qui, par une cascade de réactions d'oxydo-réduction, amène ces électrons jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène moléculaire.

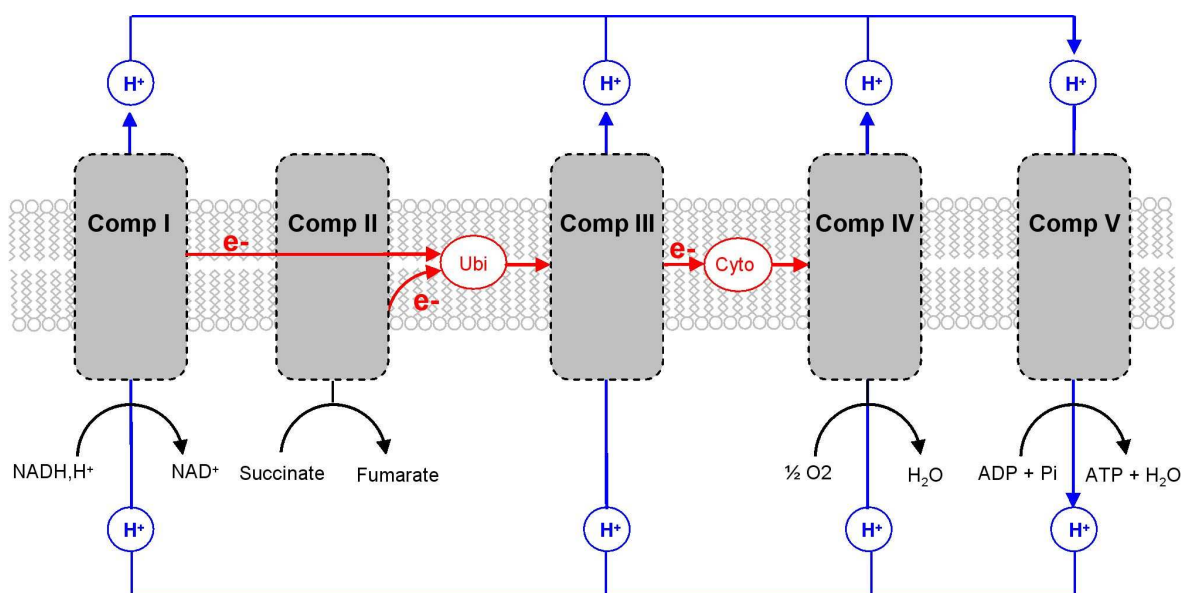
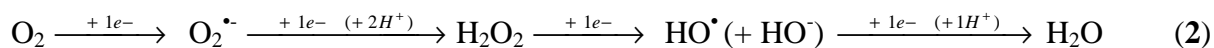


Fig. 2. Organisation simplifiée de la chaîne de transport des électrons.

Ainsi, le NADH formé dans la matrice mitochondriale cède ses 2 électrons à la NADH déshydrogénase (complexe I) accessible par la face interne de la membrane interne. Ces électrons vont cheminer du complexe I (ou NADH-ubiquinone réductase) au complexe III

(ubiquinol-cytochrome *c* réductase) *via* le transporteur mobile ubiquinone, puis du complexe III au complexe IV (ou cytochrome *c* oxydase) *via* le transporteur mobile cytochrome *c*. Au niveau du complexe IV, l'oxygène moléculaire, accepteur final des électrons, est complètement réduit en H₂O par la succession de 4 réductions (**réaction 2**).



Le FADH₂ produit dans la matrice cède, quant à lui, ses 2 électrons au complexe II (ou succinate-ubiquinone réductase). Le cheminement des électrons du complexe II au complexe IV est ensuite identique à celui suivi par les électrons fournis par le NADH, H⁺ du complexe I au complexe IV.

Par ailleurs, la réduction d'une molécule d'O₂ par 4 électrons s'accompagne de la translocation de 4 protons (fournit par NADH, H⁺ et FADH) de la matrice mitochondriale à l'espace intermembranaire au niveau des complexes I, III et IV. La membrane interne étant pratiquement imperméable aux protons, leur accumulation dans l'espace intermembranaire crée un gradient de protons. Leur retour dans la matrice ne peut se produire qu'au niveau d'un passage spécifique de l'ATP synthase appelé canal transmembranaire. La dissipation de ce gradient au niveau de l'ATP synthase mitochondriale fournit ainsi l'énergie nécessaire à la phosphorylation de l'ADP en ATP. La respiration et la phosphorylation de l'ADP sont donc couplées *via* ce gradient de protons, d'où le nom de phosphorylation oxydative.

Au final, les électrons étant apportés un à un par la chaîne respiratoire, la réduction de l'oxygène ne peut s'effectuer que par la succession de plusieurs étapes (**réaction 2**) qui sont alors susceptibles de générer des intermédiaires partiellement réduits de l'oxygène ou EROs (Halliwell et Gutteridge, 1989). Cette oxydation partielle de l'oxygène (ou fuite d'électrons) représente une faible part de la production mitochondriale, puisque seulement 1 à 3 % de l'oxygène mitochondrial seraient partiellement réduits (Boveris *et al.*, 1972 ; Boveris et Chance, 1973). Cependant, compte tenu de l'intense activité de la chaîne respiratoire dans les organismes aérobies, la fuite d'électrons d'origine mitochondriale semble être la principale source d'EROs dans la cellule, devançant les activités de la NADPH oxydase membranaire (hormi lors de l'explosion oxydative des cellules phagocytaires activées). Il a par ailleurs été montré que la fuite des électrons dans cette chaîne de transport intervient au niveau de la NADH-ubiquinone réductase (complexe I) et de l'ubiquinol-cytochrome *c* réductase (complexe III), comme l'a montré l'augmentation de la production des EROs après inhibition

par la roténone (complexe I) et l'antimycine A (complexe III) (Turrens et Bovaris, 1980 ; Turrens *et al.*, 1985).

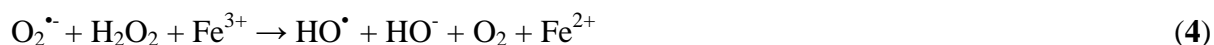
1.1.2. Devenir métabolique des espèces oxydantes

De cette génération enzymatique, résulte en premier lieu l'anion radical $O_2^{\bullet-}$ (**réaction 2**), précurseur de toutes les autres EROs à l'exception de l'oxygène singulet. On considère que l'organisme humain produit environ 5 g d' $O_2^{\bullet-}$ par jour, en dehors de toute activité physique intense (Halliwell et Gutteridge, 1989). Sous sa forme déprotonée (pH > 4,8), ce radical possède une réactivité faible vis-à-vis des substrats bio-organiques, qu'il s'agisse de lipides, de protéines ou d'acides nucléiques (Gardès-Albert et Jore, 2005). Peu réactif par lui-même, le radical $O_2^{\bullet-}$ représente cependant un précurseur d'espèces oxydantes plus « agressives » comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et surtout le radical hydroxyle (HO^{\bullet}). Le peroxyde d'hydrogène peut notamment résulter de l'action dismutasique² des superoxyde dismutases sur deux radicaux $O_2^{\bullet-}$ (**réaction 3**).



Au niveau mitochondrial, il est généralement admis que $O_2^{\bullet-}$ est généré dans la membrane interne puis libéré dans la matrice où il peut être dismuté par la SOD mitochondriale en H_2O_2 . Ainsi, à l'inverse de la faible capacité de diffusion d' $O_2^{\bullet-}$ due à sa charge négative, le peroxyde d'hydrogène peut aisément traverser la membrane pour atteindre le cytosol (Antunes et Cadenas, 2000 ; Salvador *et al.*, 2001). Notons enfin que, hormis la dismutation, la génération de H_2O_2 peut également impliquer la réduction bi-électronique de l' O_2 (**réaction 2**) sous l'action des cytochromes P_{450} , de l'acétyl coenzyme A oxydase ou de l'uricase (Fang *et al.*, 2002).

Le radical hydroxyle, quant à lui, peut provenir de la réduction de H_2O_2 par le radical $O_2^{\bullet-}$ en présence de cations métalliques comme Fe^{3+} , selon la réaction de Haber-Weiss (Haber et Weiss, 1934) (**réaction 4**).



Il peut également résulter de la réduction de H_2O_2 en présence de Fe^{2+} , dans le cadre de la réaction de Fenton (1894) (**réaction 5**).

² Une réaction de dismutation traduit la réaction d'une espèce chimique (moléculaire ou radicalaire) sur elle-même, donnant simultanément naissance à une forme plus réduite et une autre plus oxydée qu'elle-même.



La génération de radicaux HO^\bullet est un évènement crucial puisque ces radicaux sont les plus réactifs actuellement connus et qu'ils ne semblent pas pouvoir être détoxifiés par voie enzymatique. Ainsi, leur réactivité est seulement limitée par la diffusion, de sorte qu'ils réagissent dès la première collision avec un substrat organique, sans qu'un apport énergétique ne soit nécessaire ($E_a \sim 0$). Il a été calculé que la distance moyenne de diffusion de HO^\bullet était de seulement 3 nm, distance par ailleurs équivalente au diamètre moyen d'une protéine classique (Hutchinson, 1957). Ce sont donc des radicaux qui diffusent peu et qui réagissent quasiment sur le lieu de leur production. Cette forte réactivité souligne l'importance de la proximité des cations métalliques tels que Fe^{2+} (réaction de Fenton) ou Fe^{3+} (réaction de Haber-Weiss) et des EROs précurseurs (H_2O_2 et $\text{O}_2^{\bullet-}$, respectivement) vis-à-vis des protéines, des acides nucléiques ou des lipides. D'autres métaux de transition (Cu, Co, Cr, ...) sont également impliqués dans ce type de réactions ; l'accent étant majoritairement porté sur le fer puisqu'il s'agit du métal de transition le plus répandu chez les mammifères. Lorsque les conditions sont réunies pour former HO^\bullet , celui-ci peut oxyder n'importe quel substrat bio-organique de différentes manières (capture d'atome H, addition directe sur une double liaison). Dans le cas d'un mode d'action par capture d'atome hydrogène, le radical centré sur le carbone C^\bullet , créé à partir du substrat oxydable va, entre autres possibilités, réagir avec l'oxygène triplet pour former un peroxyradical en milieu aérobie. S'il n'existe qu'un seul type de radical superoxyde³ ou hydroxyle, il existe en revanche une myriade de peroxyradicaux différents suivant la nature du substrat oxydable de départ. Notons que les peroxyradicaux sont moins réactifs que les radicaux HO^\bullet , mais plus réactifs que les radicaux $\text{O}_2^{\bullet-}$ ou le monoxyde d'azote (NO^\bullet), ce dernier étant produit par les NO synthases à partir d'arginine.

Il convient, d'autre part, de distinguer deux classes de composés parmi les différentes espèces oxydantes susceptibles de se former dans les cellules. Le premier regroupe un ensemble restreint de formes oxydantes jouant un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons espèces oxydantes de *première génération*⁴. Citons les espèces oxydantes provenant de la réduction partielle de l'oxygène ($\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 et HO^\bullet), ainsi que l'oxygène singulet et le

³ Notons que $\text{O}_2^{\bullet-}$ est protoné à pH inférieur à 4,8 et s'appelle alors le radical hydroperoxyl HO_2^\bullet .

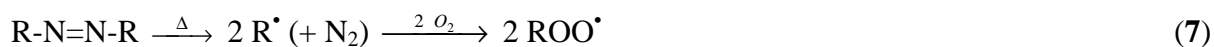
⁴ Le terme « radicaux primaires » introduit initialement a été remplacé par « espèces oxydantes de première génération », d'une part pour éviter certaines confusions comme dans le cas des radicaux LOO^\bullet , qui sont également des produits d'oxydation lipidique *primaire* et d'autre part pour intégrer à cet ensemble des composés non radicalaires comme $^1\text{O}_2$, H_2O_2 ou ONOO^- .

monoxyde d'azote (NO^\bullet) ou le peroxynitrite (ONOO^-) résultant de la réaction entre O_2^\bullet et NO^\bullet (**réaction 6**).



Le deuxième ensemble regroupe des espèces oxydantes, dites de *seconde génération*, se formant par réaction des espèces oxydantes de *première génération* sur les composés biochimiques de la cellule ou d'un quelconque environnement biochimique, comme c'est le cas notamment des lipoperoxyradicaux.

Enfin, soulignons que les mécanismes oxydatifs à l'œuvre dans les systèmes biologiques sont généralement si complexes que des études *in vitro*, en systèmes modèles utilisant des conditions artificielles, représentent bien souvent un préalable obligatoire à leur compréhension. À titre d'exemple, l'utilisation de métaux de transition sous forme cationique (Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , ...) associés à H_2O_2 constitue un système de génération de HO^\bullet de type Fenton (**réaction 5**) très employé. La réaction de Fenton peut également être induite par un système $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2$ additionné d'acide ascorbique pour réduire Fe^{3+} en Fe^{2+} . Enfin, outre les états d'oxydation II et III, les métaux de transition peuvent être amenés à des états plus élevés au sein de métallo-protéines, comme la metmyoglobine, qui sont très largement employées. La génération de peroxyradicaux, quant à elle, fait bien souvent appel aux azo-initiateurs. En effet, ces derniers sont capables de se décomposer spontanément à 37°C en radicaux R^\bullet qui, en milieu aérobie, réagissent très rapidement avec l'oxygène pour former des peroxyradicaux ROO^\bullet (**réaction 7**).



Le large emploi des azo-initiateurs pour générer un processus oxydatif *in vitro* s'explique par leur grande facilité de mise en œuvre et la génération, dans une gamme de températures modérées, de ROO^\bullet à un taux constant et reproductible. De plus, il en existe de différentes polarités (hydrophile, lipophile ou amphiphile), ce qui permet d'étudier l'oxydation dans des compartiments spécifiques.

1.2. OXYDATION DES LIPIDES

Il est généralement admis que l'oxydation des lipides s'exerce selon trois voies réactionnelles très différentes : (i) l'autoxydation non-enzymatique en chaîne médiée par des radicaux libres, (ii) la photo-oxydation non-enzymatique et non radicalaire et (iii) l'oxydation enzymatique non radicalaire initiée par des enzymes de type lipoxygénase. Les deux premiers types d'oxydation consistent plus précisément en une combinaison de réactions impliquant l'oxygène triplet $^3\text{O}_2$ à l'état fondamental et l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ correspondant à un état excité de la molécule. Les sources d' $^1\text{O}_2$ sont nombreuses, mais sa formation est bien souvent couplée à un impact photonique en présence de photosensibilisateurs (Cillard et Cillard, 2006). Il existe principalement deux types de photosensibilisateurs : de *type I* pour la riboflavine (vitamine B2) et de *type II* pour la chlorophylle et l'érythrosine (Fig. 3). Brièvement, le mécanisme de la photo-oxydation dépend du type de photosensibilisateur impliqué. Dans la réaction de type II (**réaction 8**), le photosensibilisateur ($^3\text{sens}$) à l'état triplet absorbe des photons et accède à l'état singulet ; il transmet alors son énergie à l'oxygène moléculaire qui devient excité à son tour pour former $^1\text{O}_2$, beaucoup plus réactif que l'oxygène triplet.

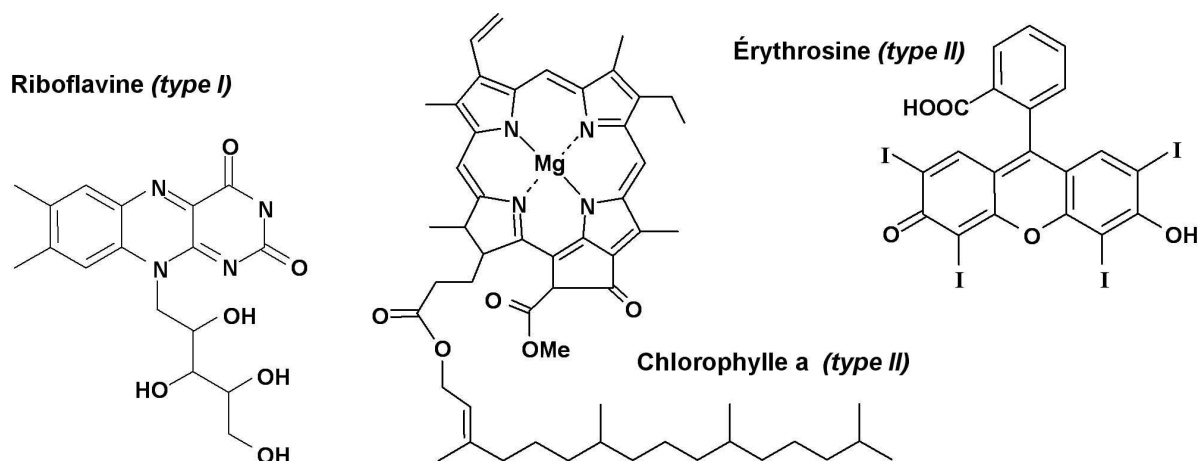


Fig. 3. Principaux photosensibilisateurs.

En raison de son caractère électrophile, l'oxygène singulet généré lors de la **réaction 8** peut se fixer directement sur les doubles liaisons C=C et conduire à la formation d'hydroperoxydes. Cette réaction dite de photo-oxydation non-radicalaire semble néanmoins mineure par rapport à l'autoxydation radicalaire en chaîne induite par $^3\text{O}_2$. Il est ainsi postulé que la photo-

oxydation fournirait principalement les hydroperoxydes qui, par décomposition en radicaux libres (notamment HO[•]), serviraient d'initiateurs à la réaction d'autoxydation (Frankel, 1998 ; Cillard et Cillard, 2006). Le mécanisme d'initiation de l'oxydation radicalaire ou enzymatique procède, quant à lui, de manière analogue et sera, par conséquent, traité indifféremment. Par contre, les mécanismes diffèrent complètement dès le premier lipoperoxyradical formé.

D'un point de vue mécanistique, la *phase d'initiation* radicalaire ou enzymatique correspond à la rupture homolytique d'un hydrogène en α de la double liaison d'un lipide (LH) comme un acide gras insaturé (AGI) ou du cholestérol. En raison d'une énergie d'activation très élevée découlant de la barrière de spin existant entre les lipides et $^3\text{O}_2$, il est exclu que l'initiation ait lieu de manière spontanée avec $^3\text{O}_2$, selon la **réaction 9**.



En revanche, la réaction est initiée sous l'effet d'agents physiques externes tels que la chaleur, les radiations ionisantes ou ultraviolettes (**réaction 10**). Des agents chimiques (radicaux libres, ions métalliques, ...) ou enzymatique (lipoxygénases, ...) peuvent également jouer le rôle d'initiateur. Notons que la plupart des lipoxygénases n'accepte pas comme substrat les AGI estérifiés sur les phospholipides, ce qui nécessite, lors de l'initiation, l'activation préalable des phospholipases A2 conduisant à la libération d'AGI puis à l'action des lipoxygénases (Thérond et Blache, 2005).



Il résulte de la capture d'un hydrogène en α d'une double liaison, la formation d'un radical libre L[•] centré sur le carbone qui va se stabiliser par réarrangement des doubles liaisons, et donner lieu à l'apparition de diènes (λ_{max} : 234 nm) (**Fig. 4**) et, dans une moindre mesure, de triènes (λ_{max} : 273 nm) conjugués.

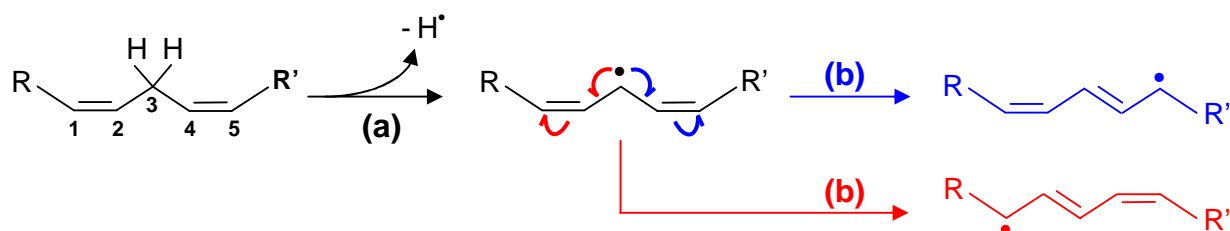


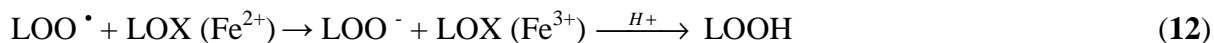
Fig. 4. Abstraction d'un hydrogène bisallylique (motif 1,4-cis-pentadiène) en α de la double liaison (a) et formation de diènes conjugués par réarrangement des doubles liaisons (b).

Notons que ces délocalisations électroniques ne peuvent avoir lieu que sur un lipide comportant au moins un motif 1,4-*cis*-pentadiène (2 doubles liaisons en position malonique) excluant donc l'acide oléique ou le cholestérol par exemple. En milieu aérobie, le radical centré sur le carbone va réagir très rapidement avec l'oxygène triplet pour générer un peroxyradical LOO[•].



La **réaction 11** ayant une énergie d'activation très faible et une constante de vitesse élevée, la concentration en LOO[•] devient beaucoup plus importante que celle de L[•] dans tous les systèmes où l'oxygène est présent. Par la suite, le devenir du lipoperoxyradical sera différent suivant que l'oxydation est médiée par les radicaux libres ou par les lipoxygénases (LOX).

(i) Dans le cadre de la peroxydation lipoxygénasique, LOO[•] va capter un électron de Fe²⁺ (fer non hémunique) du site catalytique de l'enzyme pour former l'anion peroxyde (LOO⁻), lequel va par la suite réagir avec un proton et générer un hydroperoxyde lipidique LOOH (**réaction 12**).



Ce processus enzymatique est sélectif au niveau du site d'oxydation. Ainsi, [Thérond et Blache \(2005\)](#) rapportent l'exemple de la 15-LOX humaine qui catalyse l'addition sélective d'une molécule d'oxygène sur le carbone 15 de l'acide arachidonique (C₂₂Δ₄ (9,12,15,18)) ou le carbone 13 de l'acide linoléique (C₁₈Δ₂ (9,12)). Chez l'homme, on distingue trois lipoxygénases selon leur localisation cellulaire : la 5-LOX présente dans les leucocytes, les kératinocytes et les cellules dendritiques ; la 12-LOX présente dans les leucocytes, les plaquettes, les kératinocytes et les cellules épithéliales de l'estomac ; et enfin, la 15-LOX présente dans les leucocytes, les réticulocytes et les cellules de l'épithélium pulmonaire. La différence cruciale entre l'oxydation radicalaire et enzymatique réside dans l'éloignement des ions Fe²⁺ du radical LOO[•]. Ainsi, lors de la peroxydation enzymatique, la formation de l'anion LOO⁻ est rendue possible du fait de la proximité du Fe²⁺ et du radical LOO[•]. Par conséquent, la peroxydation lipidique induite par la LOX aboutit à la formation contrôlée d'un hydroperoxyde lipidique spécifique, alors que le processus radicalaire donne lieu à une propagation.

(ii) En effet, dans le cadre de la peroxydation induite par les radicaux libres, la formation de LOO^- à partir de LOO^\bullet semble impossible en l'absence de Fe^{2+} . Par conséquent, ce dernier arrache un atome d'hydrogène à une autre molécule, par exemple un lipide insaturé, pour former un hydroperoxyde lipidique (composé d'oxydation primaire) et un autre radical L^\bullet (**réaction 13**), lequel réalimente la **réaction 11** qui marque le début de la *phase de propagation* radicalaire proprement dite.



Cette réaction radicalaire en chaîne, dite auto-entretenu, se propage à une vitesse importante, ce qui se traduit concrètement par l'accélération de la cinétique de formation des hydroperoxydes lipidiques. Il s'agit d'une réaction irréversible qui atteint rapidement un maximum.

Enfin, quelle que soit la voie réactionnelle empruntée (photo-oxydation, oxydations radicalaire ou enzymatique), l'instabilité propre des hydroperoxydes lipidiques va conduire, durant la *phase de terminaison*, à la formation de très nombreux produits d'oxydation secondaire non radicalaires. Le mécanisme principal de décomposition des hydroperoxydes correspond à la rupture de la double liaison adjacente au groupe hydroperoxy-, puis à des recombinaisons éventuelles, pour donner naissance à une grande variété d'hydrocarbures, d'alcools, de cétones, d'eicosanoïdes comme les isoprostanes et d'aldéhydes. Parmi ces derniers, certains sont spécifiques de l'oxydation d'une famille d'acides gras polyinsaturés (AGPI). Ainsi, le propanal est le principal marqueur de l'oxydation des acides gras (AG) de la série ω -3 tandis que l'hexanal et le pentanal signent l'existence d'une voie d'oxydation des AGs de la série ω -6. L'oxydation des lipides peut également générer, selon le substrat lipidique, des 4-hydroxy-2-alcénals et des dialdéhydes, les principaux étant respectivement le 4-hydroxy-2-nonéнал et le 1,3-propanedial, plus connu sous le nom usuel de malondialdéhyde (MDA).

Dans le cadre de l'oxydation des lipides, le MDA ne peut se former qu'à partir d'AGPIs comportant au moins 3 doubles liaisons, comme les acides linoléique, eicosapentaénoïque (EPA), docosahexaénoïque (DHA) et arachidonique et représente un marqueur du stress oxydant très étudié en biologie clinique. On doit à [Dahle et al. \(1962\)](#) d'avoir proposé un mécanisme de formation du MDA en accord avec les données *in vitro* (**Fig. 5**) en soulignant l'importance de la présence d'au moins 3 doubles liaisons interrompues par des méthylènes, pour favoriser la cyclisation radicalaire $\beta\gamma$. En d'autres termes, pour un AG comportant 3

insaturations, la présence d'un carbone sp^2 (portant l'insaturation) en β du radical peroxy ($-C-OO\cdot$) permet l'attaque de ce carbone par le peroxy, donnant naissance à un hétérocycle à 5 centres ; la rupture homolytique de la liaison CO-OC conduisant par la suite au MDA (**Fig. 5, insert**). En revanche, pour un AG comportant 2 insaturations, la présence de carbone sp^2 en α du peroxy limite considérablement la cyclisation radicalaire, puisque celle-ci donnerait naissance à un hétérocycle instable à 4 centres.

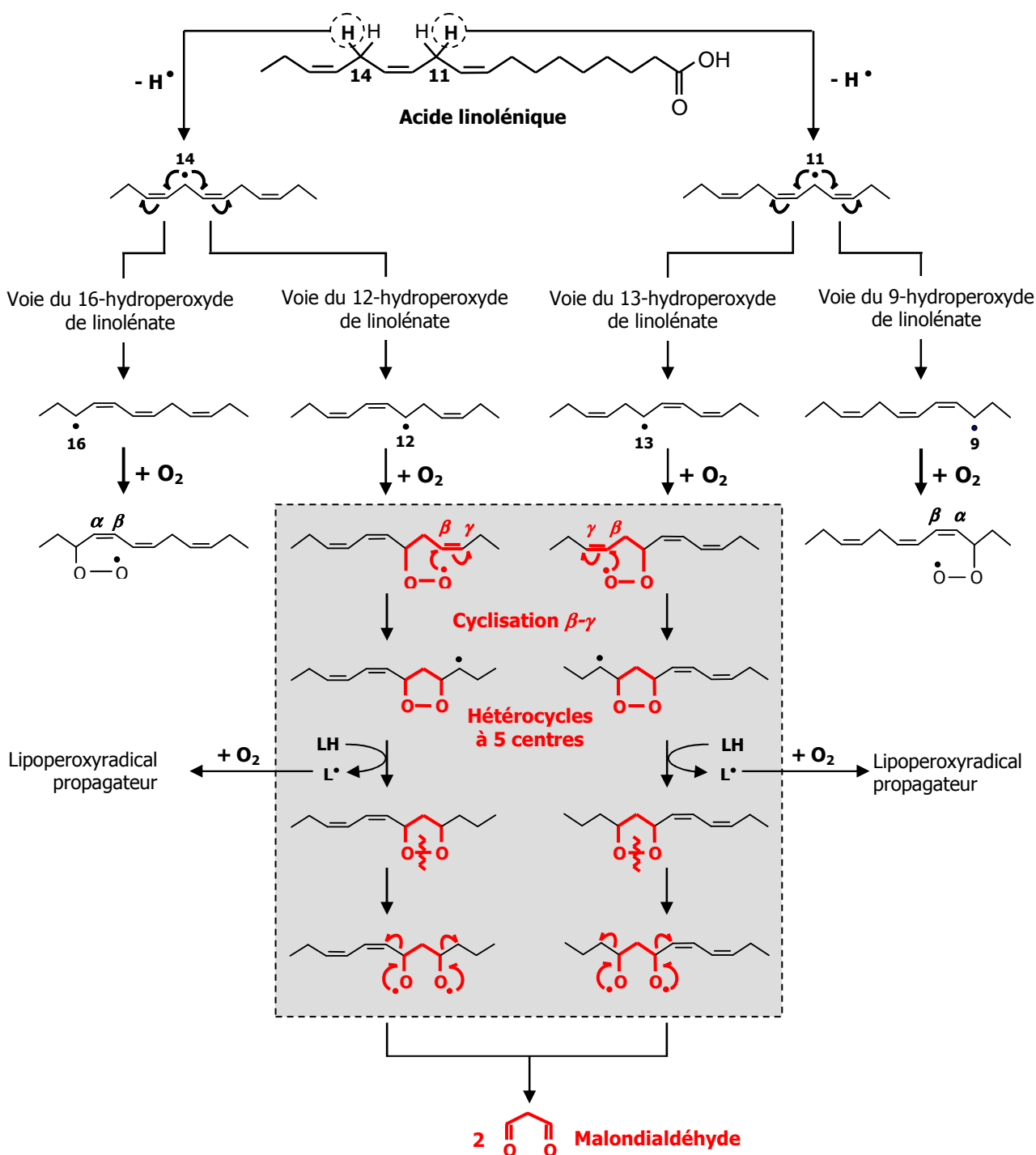


Fig. 5. Mécanisme de formation du MDA à partir d'acide linoléique. D'après *Dahle et al. (1962)*.

Concernant le 4-hydroxynonénal (4-HNE), son mécanisme de formation a été sujet à débat, depuis la découverte de son rôle cytotoxique. Cet aldéhyde fait partie de la famille des 4-hydroxyalcénals formés par attaque radicalaire ou lipoxygénasique (12 ou 15-LOX) d'acides gras des familles ω -3 et ω -6. Le 4-HNE est plus spécifiquement formé à partir de la famille ω -6 par un processus radicalaire ou médié par la 15-LOX. Le 4-HNE est produit à partir des hydroperoxydes les plus abondants issus de l'oxydation des acides gras de la famille ω -6, en l'occurrence les acides 15-hydroperoxyeicosatétraénoïque (15-HpETE) et 13-hydroperoxylinoléique. A un niveau structurel plus fin, il a été montré que le 4-HNE ne se formait ni à partir de l'acide arachidonique des lipides neutres, ni de l'acide linoléique des lipides neutres et polaires, mais seulement à partir d'acide arachidonique constitutif des phospholipides polaires (Esterbauer *et al.*, 1986b).

Finalement, la formation d'aldéhydes réactifs est un évènement critique au niveau physiopathologique, celle-ci étant impliquée dans l'altération oxydative de nombreux substrats bio-organiques. Au niveau lipidique, le MDA est susceptible de modifier les groupements NH_2 des phospholipides, altérant la microarchitecture membranaire. Le 4-HNE est susceptible, quant à lui, de former des adduits avec les groupes amino des phosphatidyléthanolamines (PE). Ainsi, l'amine des PEs renfermant du DHA en position *sn*-2 est plus sensible à l'attaque par le 4-HNE et ses dérivés (4-hydroxy-2-hexénal et 4-hydroxydodécadiénal) que l'amine des PEs comportant de l'acide arachidonique en position *sn*-2 (Bacot *et al.*, 2003). La présence de 6 insaturations maloniques sur des phospholipides membranaires induirait une plus grande exposition des amines à la phase aqueuse où se concentrent les aldéhydes. Enfin, en parallèle de la génération de ces deux molécules, l'oxydation lipidique conduit, selon la nature du lipide et des agents oxydants, à la formation d'une multitude d'aldéhydes dont le 2-hexénal, le crotonaldéhyde, l'acroléine, le glyoxal (Fu *et al.*, 1996), le 4-hydroxy-2-hexénal (Van Kujik *et al.*, 1990), le 4-oxo-2-nonénal (Lee et Blair, 2000) et le 2-hydroxyheptanal (Mlaker et Spiteller, 1996). À titre d'exemple, l'acide arachidonique oxydé par un mélange Fe^{2+} /ascorbate génère du 2-hydroxyheptanal en quantité similaire au 4-HNE, tandis que du MDA, du glyoxal et du 2-hydroxy-4-décénal (HDE) sont produits en quantité jusqu'à 100 fois plus faible (Mlaker et Spiteller, 1996).

1.3. OXYDATION DES PROTÉINES

Les chaînes latérales de nombreux acides aminés (AAs) constitutifs des protéines sont les cibles potentielles d'oxydation. Cependant, en conditions physiologiques, les cibles majeures sont les AAs soufrés (cystéine, méthionine), basiques (arginine, histidine, lysine) et aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane). Brièvement, leur oxydation par des EROs peut avoir deux conséquences.

(i) D'une part, l'oxydation des chaînes latérales d'AAs cruciaux dans la fonction de la protéine, peut conduire à une modification structurale dite « modérée », rendant la protéine inactive. C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. (ii) D'autre part, l'oxydation protéique dite « forte » peut induire une fragmentation de la chaîne polypeptidique. [Bonfont-Rousselot et al. 2005](#) ont reporté que, dans les conditions physiologiques, l'oxydation catalysée par les métaux de transition met en jeu une liaison spécifique entre Fe^{2+} (ou Cu^+) et la chaîne latérale d'un AA de la chaîne polypeptidique. Par ailleurs, la présence de H_2O_2 peut s'accompagner de la génération de radicaux HO^\bullet (réactions de Fenton et/ou Haber-Weiss) qui vont alors arracher un atome d'hydrogène sur le carbone en α d'une liaison peptidique, donnant ainsi naissance à des radicaux centrés sur le carbone. En l'absence d'oxygène, 2 radicaux centrés sur le carbone peuvent réagir entre eux pour former des ponts de réticulation intra- ou interchaînes. En présence d' $^3\text{O}_2$, le radical centré sur le carbone va former un peroxyradical. D'après [Stadtman \(1993\)](#), il s'en suit une série de réactions complexes conduisant à la formation d'un radical alkoxy, étape préalable à la fragmentation de la chaîne polypeptidique. Les réticulations intra- ou interchaînes peuvent également avoir lieu suite à la formation de ponts disulfures résultant de l'oxydation de deux fonctions thiols ([Bonfont-Rousselot et al., 2005](#)).

Outre une attaque *directe* par les radicaux libres ou les EROs, les AAs peuvent également subir des altérations oxydatives *indirectes* par les produits d'oxydation lipidique. Les produits les mieux étudiés en ce qui concerne leur interaction avec les protéines (et les acides nucléiques) sont les aldéhydes, en particulier le MDA et le 4-HNE ([Esterbauer, 1982 ; 1985](#)), bien qu'une multitude d'autres aldéhydes provenant de la peroxydation lipidique (**Fig. 6a**), de l'oxydation des acides aminés (**Fig. 6b**), des glucides (**Fig. 6c**), voire même de l'ADN (glyoxal) semble également impliquée dans ce type de réactions.

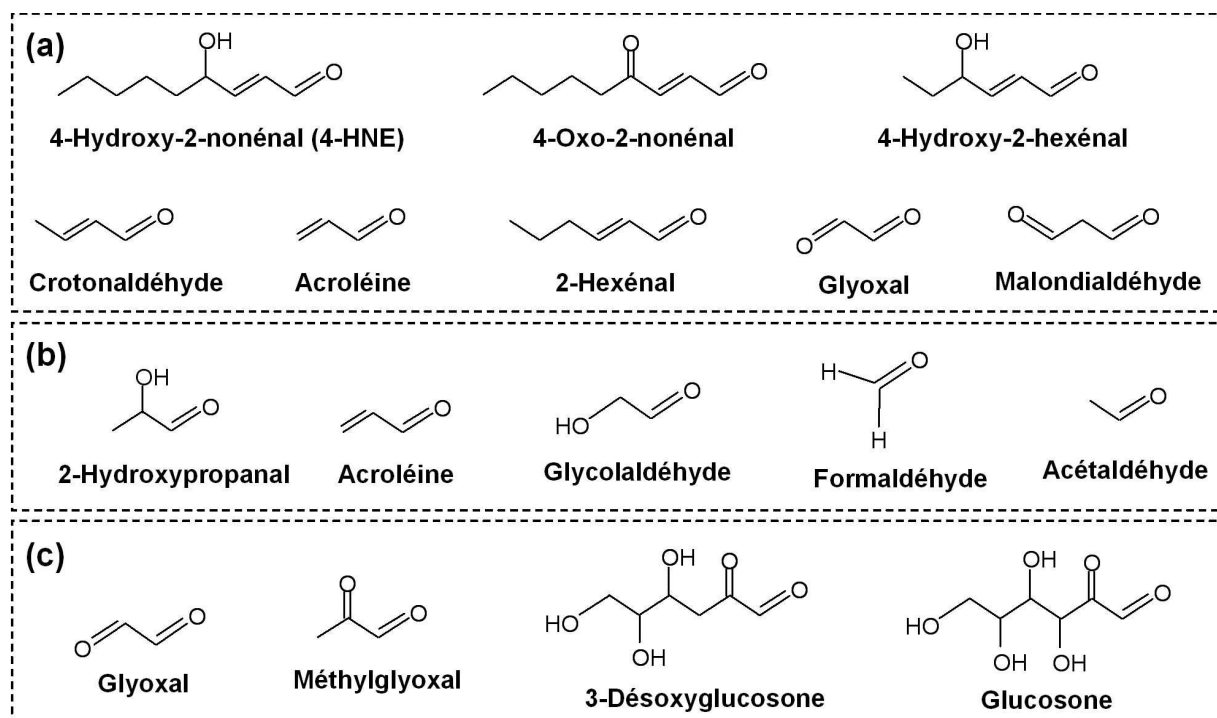


Fig. 6. Quelques aldéhydes issus des lipides (a), des acides aminés (b) et des glucides (c).

À la différence des radicaux libres et des hydroperoxydes lipidiques, ces aldéhydes sont des molécules stables, diffusant à l'intérieur et hors de la cellule et pouvant agir avec des cibles éloignées de leur site de formation comme les protéines. Souvent présentés comme des produits d'oxydation lipidique secondaire, ils agissent également comme seconds messagers cytotoxiques et apparaissent impliqués dans la plupart des effets physiopathologiques associés au stress oxydant (Uchida, 2003).

Chio et Tappel (1968 ; 1969) ont reporté que le MDA peut attaquer un grand nombre de composés cellulaires contenant des amines primaires pour donner naissance à des composés fluorescents possédant des propriétés spectrales proches de celles rencontrées dans les pigments de type lipofuscine caractéristiques du vieillissement. En raison de l'universalité de l'augmentation des lipofuscines avec l'âge (Yamada *et al.*, 2001), l'apparition de ces composés fluorescents (λ_{ex} : 340-390/ λ_{em} : 430-490 nm) milite en faveur de la théorie radicalaire du vieillissement émis par Harman (1956) et représente par ailleurs un marqueur pertinent du vieillissement physiologique et pathologique. Kikugawa et Ido (1984) et Kikugawa *et al.* (1981 ; 1984) ont proposé que les lipofuscines consistent en un ensemble de dérivés de dihydropyridine résultant d'une série de condensation entre le MDA et les amines. Yamada *et al.* (2001) ont, quant à eux, montré que la réaction impliquant le MDA et la N-acétylsine donnait naissance à différents produits fluorescents : la dihydropyridine et ses produits de réticulation, confirmant en partie les travaux de Kikugawa et Ido (1984) et

Kikugawa *et al.* (1981 ; 1984). De plus, la réaction entre le MDA et les résidus lysines de l'apolipoprotéine B100 est bien connue pour induire l'internalisation des LDLs oxydés par les récepteurs « scavengers » des macrophages humains (Fogelman *et al.*, 1980 ; Haberland *et al.*, 1982 ; 1984). Cette étape représente un événement clé dans la formation des cellules spumeuses, des stries lipidiques concomitantes et, par voie de conséquence, dans l'étiologie de l'athérosclérose. Toutefois, Yamada *et al.* (2001) montrèrent que les propriétés spectrales des LDLs oxydés par Cu^{2+} (λ_{ex} : 365-375/ λ_{em} : 430-450 nm) ne s'expliquaient pas totalement par la présence de dihydropyridines, dont les propriétés spectrales différaient quelque peu (λ_{ex} : 375-405/ λ_{em} : 435-465 nm). Ce résultat suggère l'implication d'autres adduits fluorescents dans la formation des pigments lipofuscines en parallèle des dihydropyridines, ce qui est à mettre en relation avec l'étude de Tirmenstein *et al.* (1998) montrant une augmentation drastique de la fluorescence (λ_{ex} : 360/ λ_{em} : 430 nm) suite à l'addition de glycine dans une suspension de liposomes de phosphatidylcholine à pH neutre, l'oxydation étant induite par le complexe ADP/chlorure ferrique. Avançons ici l'hypothèse que ce résultat aurait été vraisemblablement le même avec tout autre AA libre présentant au moins un NH_2 disponible.

D'autre part, s'il n'existe pas un type exclusif d'acide aminé susceptible de former des pigments fluorescents de type lipofuscine, le MDA n'est pas non plus le seul aldéhyde précurseur d'adduits fluorescents. Esterbauer *et al.* (1986 a) ont ainsi montré en premier que des LDLs traités avec du 4-HNE présentaient les mêmes propriétés de fluorescence de type lipofuscine (λ_{ex} : 360/ λ_{em} : 430 nm) que celles observées dans les LDLs oxydés. La nature chimique du fluorophore est restée inconnue jusqu'en 1998 lorsque deux équipes⁵ identifient par spectrométrie de masse et RMN un dérivé de 2-hydroxy-3-imino-1,2-dihydropyrrole formé lors de l'oxydation médiée par le 4-HNE (i) d'un dipeptide contenant de la lysine (*N* α -benzoyl-glycyl-L-lysine) (Itakura *et al.*, 1998) et (ii) d'un dérivé de lysine, la *N* α -acétyllysine (Tsai *et al.*, 1998). Ces derniers auteurs ont également étudié l'apparition de cet adduit dans une protéine traitée avec le 4-HNE. Pour cela, des anticorps polyclonaux spécifiquement dirigés contre le 2-hydroxy-3-imino-1,2-dihydropyrrole ont été préparés, et ont par la suite permis de détecter cet adduit dans le produit de réaction entre la glucose-6-phosphate déshydrogénase et le 4-HNE. Cependant, la fluorescence du produit de la réaction entre la glucose-6-phosphate déshydrogénase et le 4-HNE (λ_{ex} : 340/ λ_{em} : 415 nm) diffère légèrement de l'adduit obtenu en milieu modèle (λ_{ex} : 360/ λ_{em} : 430 nm), suggérant soit

⁵ Notons que la même année Xu et Sayre (1998) identifient un dérivé de 2-hydroxy-3-imino-1,2-dihydropyrrole lors de la réaction entre le 4-hydroxy-2-hexéanal et la *n*-butylamine.

l'implication d'autres fluorophores à côté des 2-hydroxy-3-imino-1,2-dihydropyrroles, soit un changement des propriétés de fluorescence dû à l'environnement protéique. D'autre part, de manière analogue au MDA, le 4-HNE peut réagir avec d'autres acides aminés que la lysine, puisqu'il a été montré que cet aldéhyde pouvait former des adduits avec l'histidine et la cystéine. Ces adduits sont par ailleurs de nouveaux épitopes induisant la formation d'auto-anticorps. Les réponses auto-immunes qui en résultent jouent vraisemblablement un rôle pathologique, comme en témoigne la détection d'épitopes dérivés du 4-HNE dans la plupart des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Ando *et al.*, 1998 ; Calingasan *et al.*, 1999), de Parkinson (Yoritaka *et al.*, 1996) et la sclérose latérale amyotrophique (Shibata *et al.*, 2001), mais aussi dans les tissus de patients atteints de carcinomes rénaux (Okamoto *et al.*, 1994), de pré-éclampsie (Morikawa *et al.*, 1997) et de néphropathies diabétiques (Suzuki *et al.*, 1999). D'autre part, la diversité des lipides, des acides aminés et des glucides oxydables conduit à la formation de très nombreux aldéhydes réactifs pouvant produire des adduits avec les protéines. À l'instar du MDA et du 4-HNE, ces aldéhydes peuvent tour à tour représenter des agents potentiels de modification des LDLs, des réactants pour la formation de lipofuscines et enfin des inducteurs de réactions auto-immunes. À titre d'exemples, citons le 4-hydroxy-2-hexenal (Shibata *et al.*, 2004), le glyoxal, l'acroléine (Calingasan *et al.*, 1999), ainsi que le 4-oxo-2-nonanal (Oe *et al.*, 2003).

Finalement, à l'exception notable de l'oxydation des cystéine et méthionine pour lesquelles des systèmes spécifiques de réversion de l'oxydation ont été mis en évidence, l'oxydation des autres acides aminés apparaît comme un phénomène irréversible (Friguet *et al.*, 2003). À défaut de système de réparation, il a été découvert que l'organisme disposait d'une véritable « machinerie » d'élimination des protéines endommagées : le protéasome, ubiquitaire chez les eucaryotes et les archaebactéries. En lien avec son activité, il est suspecté depuis quelques années que l'augmentation des protéines carbonylées au cours du vieillissement ne serait pas due uniquement à une augmentation des agressions radicalaires, mais également à une moindre efficacité du protéasome (en particulier l'activité peptidyl-glutamylpeptide hydrolase). Il a, de plus, été montré que les protéines modifiées par le 4-HNE devenaient non seulement résistantes à la dégradation par le protéasome, mais qu'elles pouvaient également inhiber son activité protéolytique vis-à-vis d'autres protéines oxydées (Friguet et Szweda, 1997). Le protéasome qui est inhibé par les pigments de type lipofuscine, est en outre, sensible à l'attaque des EROs et de certains aldéhydes comme le 4-HNE (Friguet, 2003). Enfin, il semblerait que sous restriction protéique ou calorique, l'activité du protéasome soit maintenue malgré le vieillissement (Delattre *et al.*, 2005).

1.4. OXYDATION DES ACIDES NUCLÉIQUES

De par son rôle de mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants, l'ADN constitue une cible cellulaire importante pour les attaques oxydantes. De manière analogue aux protéines, il convient de distinguer ici les processus oxydatifs directs médiés par les EROs, de ceux indirects induits par les aldéhydes. La description des différents dommages oxydatifs subits par l'ADN s'articulera autour de la **Fig. 7** représentant les principales cibles d'attaques oxydantes.

En l'état actuel des connaissances, l'oxydation de l'ADN par les EROs (principalement HO[•]) résulte majoritairement en l'apparition de bases oxydées, de sites abasiques, d'adduits intra-caténaires, de cassures de brin, et enfin de pontages ADN-protéines.

Parmi les différentes bases oxydées, la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine (provenant de la guanine) est apparemment la plus abondamment détectée, mais également la plus recherchée. Les bases oxydées, comme la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine, augmentent avec l'âge et peuvent atteindre jusqu'à 10 000 bases oxydées par jour et par cellule (Favier, 2003). Ces bases oxydées sont considérées comme potentiellement mutagènes car elles peuvent s'apparier avec d'autres bases que celles qui leur sont naturellement complémentaires. Ainsi, la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine s'apparie préférentiellement avec l'adénine (purique) plutôt qu'avec la cytosine (pyrimidique) qui est la base normalement appariée à la guanine (purique), ce qui aboutit après réplication à une mutation de transversion (ou transversion)⁶ G:C→T:A.

Pour contrer ces effets mutagènes, nos cellules sont pourvues de puissants systèmes de réparation de l'ADN, parmi lesquels les systèmes par excision de bases (BER) ou de nucléotides (NER). La plupart des bases oxydées est réparée avant que la cellule n'atteigne le stade de la réplication au cours duquel un dommage oxydatif peut se fixer en mutation. Or, la prépondérance de la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine est peut-être à rapprocher du fait que le taux de réparation des lésions puriques est plus lent que celui des lésions pyrimidiques (Jaruga et Dizdaroglu, 1996). Hormi cette base oxydée spécifique, signalons l'existence d'autres bases oxydées, résultant principalement d'attaque radicalaire (**Fig. 7**). Nous citerons, à titre d'exemples, les glycols de thymine et de cytosine, la 8-hydroxy-adénine et la formamido-pyrimidine. La liaison entre la base et le désoxyribose (**Fig. 7**) peut également être

⁶ On parle de transversion lorsqu'il y a substitution d'une base purique par une base pyrimidique (ou inversement). A l'opposé, une transition est une mutation causée par la substitution d'une base purique par une autre base purique (ou d'une base pyrimidique par une autre base pyrimidique).

la cible d'une oxydation, créant un site abasique par rupture de la liaison entre la base et le squelette désoxyribose. Si la base perdue est pyrimidique (CT), on parle de site apyrimidique ; dans le cas d'une base purique (AG), de site apurique.

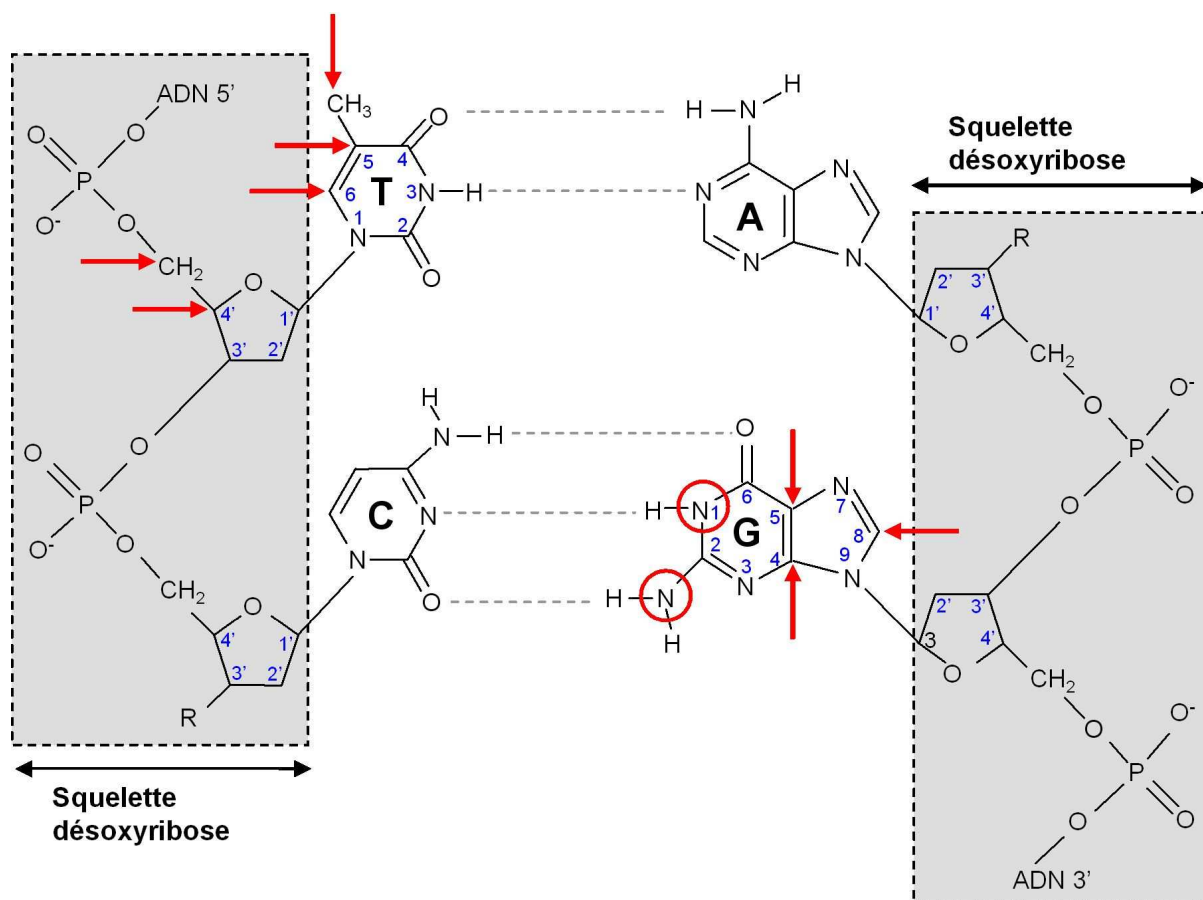


Fig. 7. Principales cibles de l'attaque oxydante sur les bases Thymine et Guanine de l'ADN. Les flèches représentent les sites d'attaque par les EROs ; les cercles représentant les sites impliqués dans la formation d'adduits avec des aldéhydes ou des époxydes.

En outre, les radicaux libres peuvent attaquer le désoxyribose en position 4' (**Fig. 7**) par capture d'un atome d'hydrogène. Le radical correspondant va ensuite réagir et rompre la liaison PO-C(3') créant une coupure de chaîne simple brin. Dans ce cas, les réparations sont extrêmement rapides et fiables. À titre d'exemple, l'ADN d'une cellule subit en moyenne 150000 cassures par jour. Par contre lors de cassures double brin, la réparation est beaucoup plus lente et difficile, par absence du modèle original que constitue le brin non lésé. L'issue la plus fréquente est la réparation fidèle et la survie de la cellule, dans le cas contraire, l'échec de la réparation entraîne la mort cellulaire. Dans certains cas, plus rares, les réparations fautives peuvent ne pas entraîner la mort de la cellule et donc constituer des mutations non létales. Si le système immunitaire ne détecte pas la cellule mutante, alors la molécule mutante reste dans l'organisme sans qu'il n'y ait encore d'effets notables sur l'organisme.

Des dommages indirects aboutissant à la formation d'adduits, peuvent également résulter de la réaction des bases avec les aldéhydes (ou époxyaldéhydes) issus de la peroxydation lipidique. En l'état actuel des connaissances, 3 types d'adduits sont décrits : (i) les propano-dérivés impliquant le crotonaldéhyde, l'acroléine et le 4-HNE, (ii) les éthéno-dérivés impliquant les époxydes de crotonaldéhyde, d'acroléine et de 4-HNE et enfin, (iii) les adduits spécifique du MDA. À défaut d'une description exhaustive, nous étudierons le cas spécifique du 4-HNE et de la guanine.

La formation de propano-dérivés de guanine procède dans un premier temps d'une attaque nucléophile de l'amine primaire du résidu guanine sur le carbone 3 du 4-HNE (**Fig. 8a**). Le doublet non liant de l'amine secondaire attaque ensuite le carbone 1 portant la fonction aldéhyde du 4-HNE pour former le 1, N^2 -propano-dérivé de guanine (**Fig. 8b**).

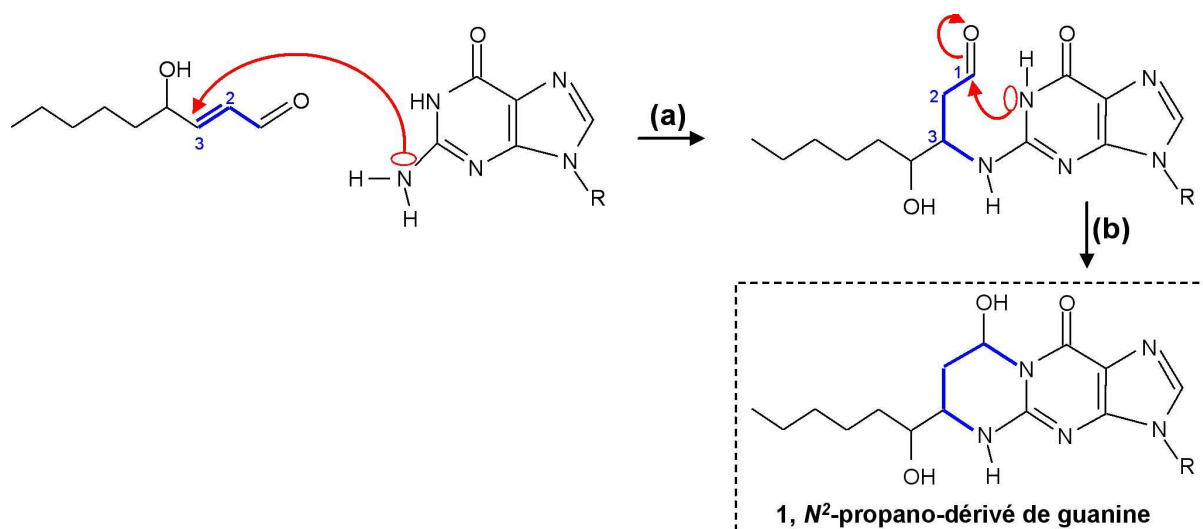


Fig. 8. Mécanisme de formation d'un propano-dérivé de guanine par réaction avec le 4-hydroxynonanal.

La formation de l'éthéno-dérivé de guanine implique, quant à elle, une première oxydation par H₂O₂ du 4-HNE en époxyde (4-HNE-époxyde) (**Fig. 9a**), qui va par la suite être le site d'une attaque nucléophile sur le carbone 1 par le doublet non liant de l'amine primaire du résidu guanine (**Fig. 9b**). Un éthéno-dérivé appelé 1- N^2 -éthéno-dérivé de guanine est formé suite à une deuxième attaque par l'amine secondaire du résidu guanine sur le carbone 2 du 4-HNE-époxyde (**Fig. 9c**) suivie d'une rupture hétérolytique de la liaison C³-C² et d'une perte d'eau (**Fig. 9d**).

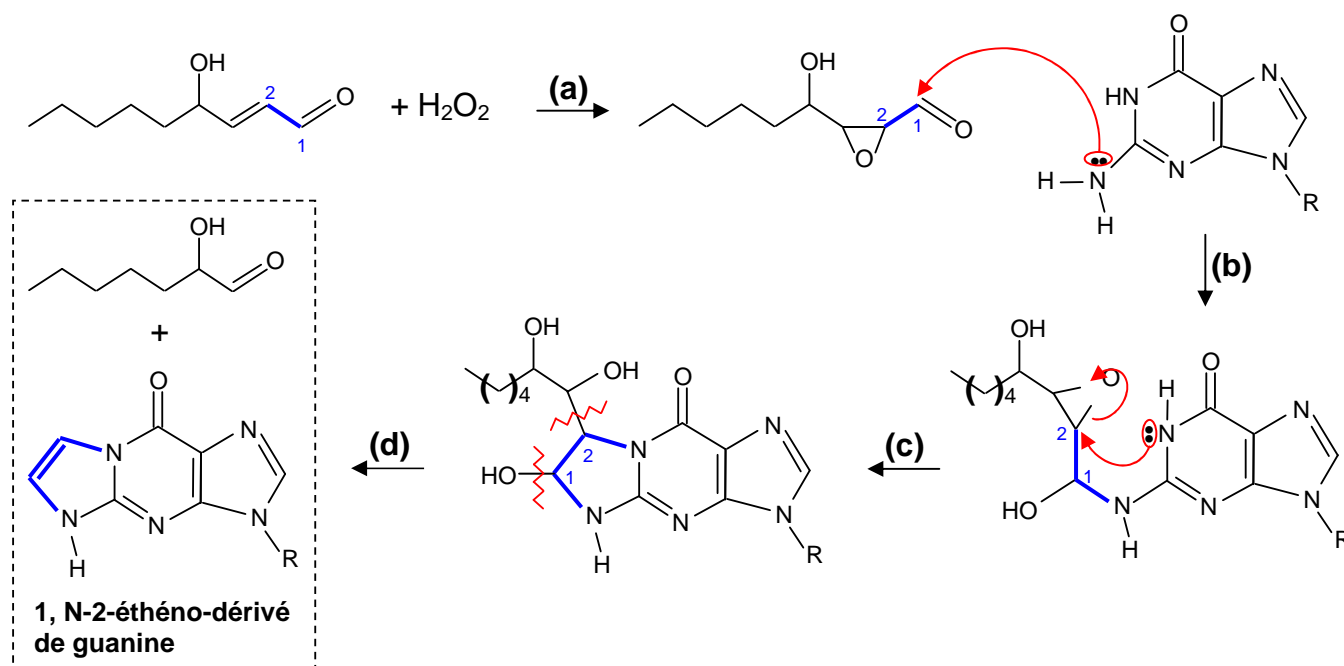


Fig. 9. Mécanisme de formation d'un éthéno-dérivé de guanine à partir du 4-hydroxynonanal.

Chez les mammifères, ces éthéno-dérivés sont réparés efficacement par le système BER, consistant en l'élimination de l'adduits par hydrolyse de la liaison entre la base et le désoxyribose, ce qui aboutit à la formation d'un site apurique. Ces éthéno-dérivés, lorsqu'ils ne sont pas réparés, vont principalement induire des tranversions et transitions. Il est par ailleurs remarquable que, de manière analogue à la découverte de [Jaruga et Dizdaroglu \(1996\)](#) concernant la moindre efficacité du taux de réparation des lésions puriques (AG) par rapport aux pyrimidiques (TC), [Dosanjh et al. \(1994\)](#) montrèrent que les éthéno-dérivés d'adénine et de cytosine étaient réparés plus efficacement que ceux de la guanine. L'effet mutagène potentiellement carcinogène de ce type d'adduit est largement documenté ([Schaub et al., 1991](#) ; [Esterbauer, 1993 a et b](#) ; [Vaca et al., 1988](#) ; [Vaca et Harms-Ringdahl, 1989](#) ; [Brambilla et al., 1989](#)). A titre d'exemple, citons l'étude de [Wang et al. \(1996 b\)](#) portant sur des sujets atteints ou non d'un cancer du sein et montrant que les adduits ADN-MDA sont détectés de manière significativement plus importante chez le groupe des cancéreux. D'autre part, si des aldéhydes peuvent être formés par peroxydation lipidique (mais aussi à partir de glucides et d'acides aminés), il semble que l'ADN puisse lui-même former du glyoxal, sous oxydation médiée par le système $\text{FeSO}_4\text{-EDTA-O}_2$ ([Murata-Kamiya et al., 1995](#)). Ce glyoxal attaque en retour l'ADN, provoquant des substitutions de bases apparaissant majoritairement sur la paire G:C sous la forme de tranversions G:C→T:A ([Murata-Kamiya et al., 1997](#)).

Citons également l'attaque radicalaire des protéines qui peut entraîner des pontages ou des adduits de type lysinoguanine avec l'ADN. Ce processus est d'autant plus important que les protéines sont très nombreuses à entrer en contact avec l'ADN pour le protéger (histones) ou pour le lire (enzymes et facteurs de la réplication ou de la transcription). Le rôle des nombreux cations métalliques (Fe, Mg, Zn, Cu, Ni, Cd, ...) fixés à l'ADN, qui est un polyanion, est crucial dans l'amplification ou l'orientation du profil de ces lésions.

Enfin, si la mitochondrie est considérée comme l'une des principales sources d'EROs intracellulaires, elle en est également la principale cible. Notons à cet égard la sensibilité particulière de l'ADN mitochondrial (ADNm) au stress oxydant, de par (i) sa proximité du lieu principal de formation des EROs (matrice mitochondriale), (ii) sa moindre capacité de réparation des lésions à fort encombrement (Dianov *et al.*, 2001), et enfin (iii) l'absence d'histones. Il a ainsi été estimé chez la drosophile (Haag-Liautard *et al.*, 2008) que le taux global de mutation de l'ADNm par paire de base et par génération était 10 fois supérieur à celui de l'ADN nucléaire. L'ADNm muté pourrait d'ailleurs avoir un avantage sélectif et se répliquer plus rapidement que l'ADN non muté (Grandemange, 2005). Une altération oxydative de l'ADNm pourrait donc altérer le fonctionnement de la chaîne respiratoire, notamment par l'incorporation dans les enzymes respiratoires de sous-unité(s) protéique(s) codée(s) par l'ADNm muté. Ceci pourrait déclencher un cercle vicieux augmentant la production d'EROs qui, en retour, vont causer des dommages oxydatifs à l'ADNm. Cette boucle d'autopotentialisation est aujourd'hui suspectée d'être une cause du vieillissement cellulaire plutôt qu'une conséquence (Salvioli *et al.*, 2001 ; Sastre *et al.*, 2003) et supporte la théorie mitochondriale du vieillissement. Ce fut encore Harman (1972) qui, précisant sa théorie radicalaire du vieillissement, suggéra en 1972 que la mitochondrie pouvait être l'horloge biologique du vieillissement. A l'appui de sa théorie, de nombreux faits expérimentaux ont été apportés, dont les plus significatifs sont probablement (i) la sénescence rapide des cellules de jeunes rats induite par micro-injection de mitochondries extraites de fibroblastes de rats âgés (Corbisier et Remacle, 1990 ; 1993) et (ii) la corrélation négative établie entre la production mitochondriale d'hydroperoxyde et la durée de vie maximale chez les espèces vivantes (Sohal et Weindruch, 1996 ; Barja, 1999).

2. ANTIOXYDANTS

Au cours de l'évolution, les organismes aérobies dont l'Homme se sont adaptés pour contrer les effets délétères du stress oxydant, notamment par la mise en place de systèmes de défense appelés antioxydants. Le terme d'antioxydant, par l'importance qu'il revêt, mérite que l'on s'attarde sur sa définition. [Chipault \(1962\)](#) définit un antioxydant alimentaire comme « *une substance qui, en faible quantité, est capable de prévenir ou de fortement retarder l'oxydation du matériel facilement oxydable, notamment les graisses* ». Une définition légèrement modifiée et couvrant tous les antioxydants a été proposée par [Halliwell et Gutteridge \(1989\)](#) selon lesquels un antioxydant est « *une substance qui, présente en faible concentration par rapport à un substrat oxydable, retarde ou prévient significativement l'oxydation de ce substrat* ». Cette définition générale nous semble intéressante car elle ne restreint pas l'activité antioxydante à un mécanisme d'action exclusif, et met d'autre part l'accent sur le rapport antioxydant/substrat, lequel doit être largement en faveur du substrat. Enfin, constatant que certaines molécules comme l'acide urique sont de bons piègeurs de radicaux hydroxyles, mais de mauvais piègeurs des radicaux oxoferryles, [Mantle et al. \(1998\)](#) proposent d'abandonner le terme d'antioxydant (terme galvaudé de signification faible) pour une désignation plus précise spécifiant la nature de l'espèce oxydante à réduire (e.g. anti-HO[•] ; anti-LOO[•]).

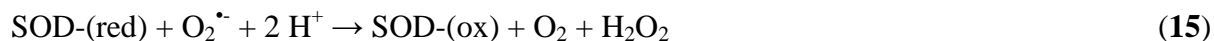
2.1. MODES D'ACTION DES ANTIOXYDANTS

La diversité des voies d'oxydation conduit nécessairement à une multiplicité de voies d'antioxydation : détoxification endogène des EROs par voie enzymatique, piégeage des EROs par des substances antiradicalaires non enzymatiques, chélation de métaux de transition, désactivation de l'oxygène singulet, filtration des UVs, inhibition des enzymes pro-oxydantes, co-facteurs d'enzymes antioxydantes, stimulation de l'expression d'enzymes antioxydantes ... Nous nous bornerons, ici, à ne décrire que les plus connues.

2.1.1. Détoxification endogène enzymatique des EROs

La détoxification des EROs constitue une voie de prévention primordiale de l'oxydation, principalement relayée par les systèmes antioxydants enzymatiques endogènes. Tout d'abord, les superoxyde dismutases (SOD) catalysent la réaction de dismutation de l'anion superoxyde (première espèce toxique de l'oxygène) en peroxyde d'hydrogène et en oxygène, assurant

ainsi la première ligne de défense contre le stress oxydant. La **réaction 16** représente le bilan des demi-équations **14** et **15**.



La famille des SODs regroupe trois métallo-enzymes qui diffèrent en fonction de leur localisation et des oligo-éléments contenus dans leur site actif. Il existe ainsi deux SODs à cuivre et zinc (Cu-Zn-SOD), l'une cytosolique, l'autre extracellulaire, ainsi qu'une SOD à manganèse (Mn-SOD) présente dans la membrane mitochondriale interne. La surexpression de cette enzyme antioxydante chez la mouche *Drosophila melanogaster* a fait l'objet de plusieurs études qui ont conduit à des résultats discordants. Parmi ces études, citons celle de [Parkes et al. \(1998\)](#) qui a montré que la surexpression spécifique de la SOD cytosolique humaine dans les neurones moteurs des drosophiles conduisait à un allongement de leur durée de vie pouvant atteindre 40 %. Par ailleurs, au niveau structural, la surface de la SOD cytosolique est chargée négativement, repoussant de ce fait les anions superoxydes, à l'exception de ceux qui s'engagent dans un « chemin » chargé positivement qui conduit au site actif de l'enzyme ([Thérond et Bonnefont-Rousselot, 2005](#)). Finalement, dans les conditions physiologiques normales, le peroxyde d'hydrogène généré par les SODs sera détoxifié par d'autres systèmes endogènes enzymatiques, tels que la catalase, les glutathion peroxydases, les thiorédoxine peroxydases, ainsi que le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase.

La première d'entre elles, la catalase (Cat), a pour unique substrat le peroxyde d'hydrogène qu'elle réduit en eau et en oxygène moléculaire (**réaction 17**) par dismutation.



Cette enzyme hémunique contenant un atome de fer à l'état Fe^{3+} est essentiellement présente dans les peroxysomes, les érythrocytes (globules rouges), les hépatocytes et les reins. Plusieurs polymorphismes du gène ont été décrits, dont la plupart sont associés à l'acatalasémie, maladie caractérisée par une activité catalasique érythrocytaire égale à 0,2-4 % de l'enzyme sauvage ([Forsberg et al., 2001](#)).

Un deuxième groupe d'enzymes connu sous le nom de glutathion peroxydases (GSH-Px), exerce une action détoxifiante vis-à-vis de trois espèces réactives : le peroxyde d'hydrogène, les hydroperoxydes lipidiques et le peroxynitrite qui est une espèce très réactive de l'azote. Les GSH-Px qui sont des enzymes sélénio-dépendantes contenant quatre atomes de sélénium situés aux centres actifs de l'enzyme (sélénocystéine), voient leur activité diminuer lors du vieillissement et du diabète (Muruganandam *et al.*, 1992 ; Vericel *et al.*, 2004). Ces enzymes accélèrent la réaction d'oxydation de la fonction thiol du glutathion (tripeptide de γ -glutamyl-cystéinyl-glycine, symbolisé ici par GSH) par le peroxyde d'hydrogène, qui est alors réduit en eau (**réaction 18**) ou par un hydroperoxyde alors réduit en alcool et en eau (**réaction 19**). Notons que ce thiol peut s'oxyder directement avec les EROs, bien qu'il semble principalement utilisé dans l'organisme comme substrat des GSH-Px.



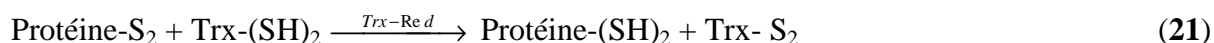
Par la suite, un autre système enzymatique impliquant la glutathion réductase (GSH-Red) permet de régénérer le glutathion à partir de son dimère (GS-GS) restaurant ainsi l'activité des GSH-Px. Pour ce faire, la GSH-Red a besoin de cofacteur NADPH (**réaction 20**).



Enfin, bien qu'il fût initialement pensé que les GSH-Px utilisaient exclusivement le glutathion comme substrat réducteur, des preuves récentes militent en faveur d'une spécificité de la plupart des enzymes de type GSH-Px pour la thiorédoxine (protéine à thiol) qui serait utilisée comme agent réducteur à l'instar du glutathion. Ainsi, Toppo *et al.* (2008) ont montré que la GSH-Px cytosolique basée sur la sélénocystéine et utilisant le glutathion comme substrat est une « invention » récente de l'évolution et, qu'à l'opposé de ce qui était jusqu'alors pensé, les peroxydases spécifiques de la thiorédoxine et basées sur la cystéine (appelées thiorédoxines peroxydases, Trx-Px) semblent à la fois plus anciennes et plus répandues dans la plupart des organismes de tous les règnes vivants.

Si les thiorédoxines semblent être des substrats réducteurs pour les peroxydases, elles sont également les substrats oxydants des thiorédoxines réductases. Ainsi, les thiorédoxines (Trx-(SH)_2) qui sont des protéines à disulfure/thiol majoritaires dans le monde vivant, exercent une activité antioxydante intrinsèque par l'intermédiaire de leurs groupes thiols. Ces

protéines sont notamment impliquées dans la réduction des ponts disulfures présents au sein d'autres protéines oxydées (Protéine-S₂), sous l'action catalytique de la thiorédoxine réductase (Trx-Red) (**réaction 21**).



Une fois oxydée, la thiorédoxine (Trx-S₂) est réduite par la thiorédoxine réductase qui possède un groupe sélénocystéine dans son site actif (**réaction 22**).



En marge de la réduction des ponts disulfures protéiques, la Trx-(SH)₂ intervient non seulement dans la détoxification des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène, mais également dans la régénération de l'acide ascorbique à partir du radical ascorbyle. Malgré leur plus faible efficacité catalytique par rapport aux GSH-Px et Cat, ces enzymes pourraient jouer un rôle majeur dans l'élimination des hydroperoxydes du fait de leur quantité importante (0,1 à 0,8 % des protéines solubles cellulaires) et de leur large distribution dans la cellule.

In vivo, il est classiquement admis qu'il existe une coopération étroite entre ces différentes enzymes. Ainsi, l'activité SOD qui dismute l'anion superoxyde conduit à la formation de peroxyde d'hydrogène dont la détoxification est alors prise en charge par le système catalase et/ou GSH-Px.

2.1.2. Substances antiradicalaires non enzymatiques

En appui des premières lignes de défenses enzymatiques, cette catégorie d'antioxydants va le plus souvent réduire les radicaux libres par cession d'un atome hydrogène (**réaction 23**).



Pour ce faire, ces antiradicalaires doivent posséder un pouvoir réducteur inférieur à celui du substrat. Il s'agit principalement de composés phénoliques mono- ou poly-hydroxylés, de tocophérols, de tocotriénols, d'ubiquinol, de thiols (glutathion), voire même d'amines (acide urique, bilirubine). Ces antioxydants exogènes (exception faite de l'ubiquinol, du glutathion, de l'acide urique et de la bilirubine) sont principalement apportés par l'alimentation.

2.1.2.1. Origine et structure chimique

(i) Les tocophérols et, dans une moindre mesure, les tocotriénols sont majoritairement apportés par les huiles végétales de graines ou de drupes (olive, palme) oléagineuses. À titre d'exemple, l'huile de palme représente la principale source de tocotriénols. Par ailleurs, compte tenu des besoins de l'industrie alimentaire, les tocophérols (en particulier la forme α) sont principalement produits par synthèse chimique et commercialisés sous la forme stabilisée d'esters acétiques (Berset, 2006). Notons que ces esters n'exercent pas d'activité antioxydante en propre car l'hydroxyle phénolique est impliqué dans la liaison ester ; cette liaison étant par la suite rompue en conditions acides telles que celles rencontrées dans l'estomac. Par ailleurs, la présence de 3 centres d'asymétrie (Fig. 10) sous configuration RRR pour l' α -tocophérol naturel, rend ce dernier plus actif *in vivo* que les mélanges racémiques de synthèse (Bramley *et al.*, 2000).

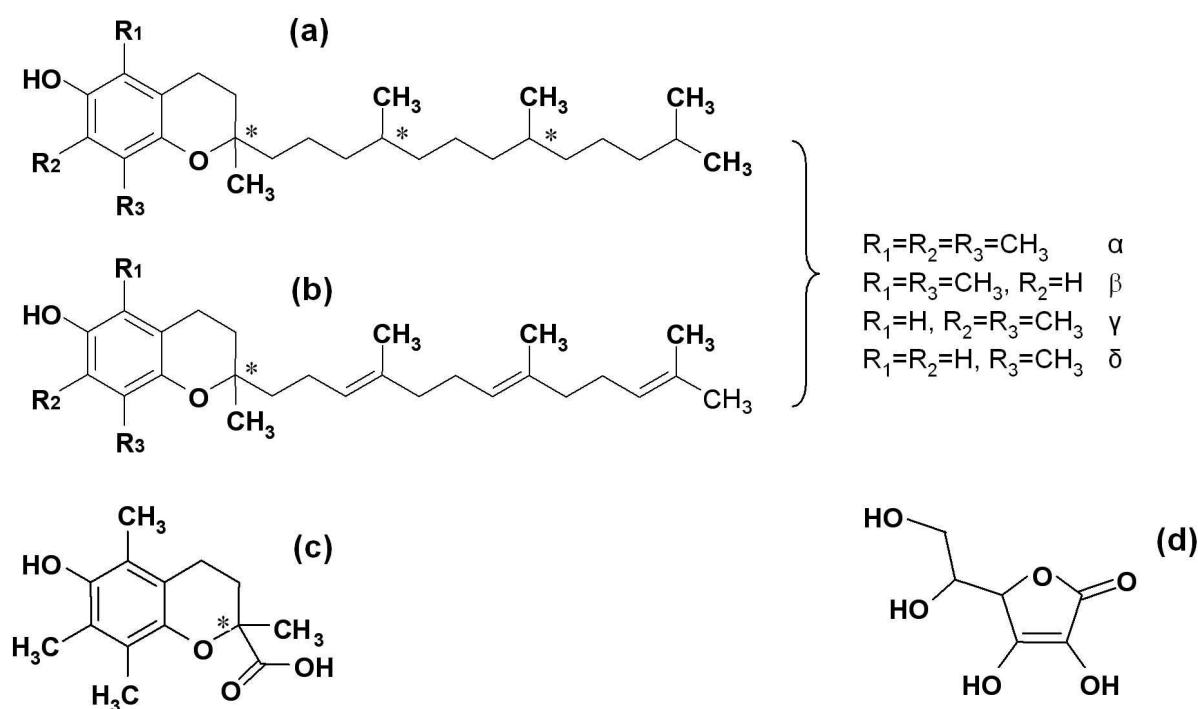


Fig. 10. Structure chimique des tocophérols (a), des tocotriénols (b), du Trolox (c) et de l'acide ascorbique (d).

(ii) L'acide ascorbique (Fig. 10), également connu sous le nom de vitamine C (acide ascorbique et ses sels), peut être considéré comme un dérivé cyclique des hexoses. Alors que la plupart des mammifères sont capables de le synthétiser au niveau hépatique ou rénal (ce n'est donc pas une vitamine pour eux), la majorité des primates (dont l'être humain), le cochon d'Inde et certains oiseaux et poissons, en sont incapables. Ceci est le résultat d'une mutation

génétique survenue il y a 40 millions d'années, bloquant la transformation du glucose en acide ascorbique. L'organisme humain dépourvu de cette capacité de synthèse doit donc la puiser dans l'alimentation, sous forme de légumes frais, de fruits (en particulier les agrumes) et de jus de fruit. Notons que l'acide ascorbique est la plupart du temps présent sous sa forme stable énolique réduite.

(iii) Enfin, les composés phénoliques regroupent un très vaste ensemble de molécules (plusieurs milliers) réparties en différentes familles et classes. Citons les acides phénoliques, les esters phénoliques principalement représentés par les acides chlorogéniques ou hydroxycinnamates (**Fig. 12**), les alcools phénoliques (**Fig. 13**), les secoiridoïdes (**Fig. 13**), les stilbénoides, les diterpènes et les flavonoïdes (**Fig. 14**). Ces molécules dérivent toutes de la voie du shikimate et du métabolisme des phénylpropanoïdes, à l'œuvre dans le monde végétal. Au niveau histologique, les composés phénoliques hydrosolubles sont localisés dans la vacuole, tandis que les formes plus complexes, généralement plus lipophiles, se retrouvent dans les structures pariétales (lignines, acides phénoliques intégrés dans la cutine ou la subérine (**Fig. 11**).

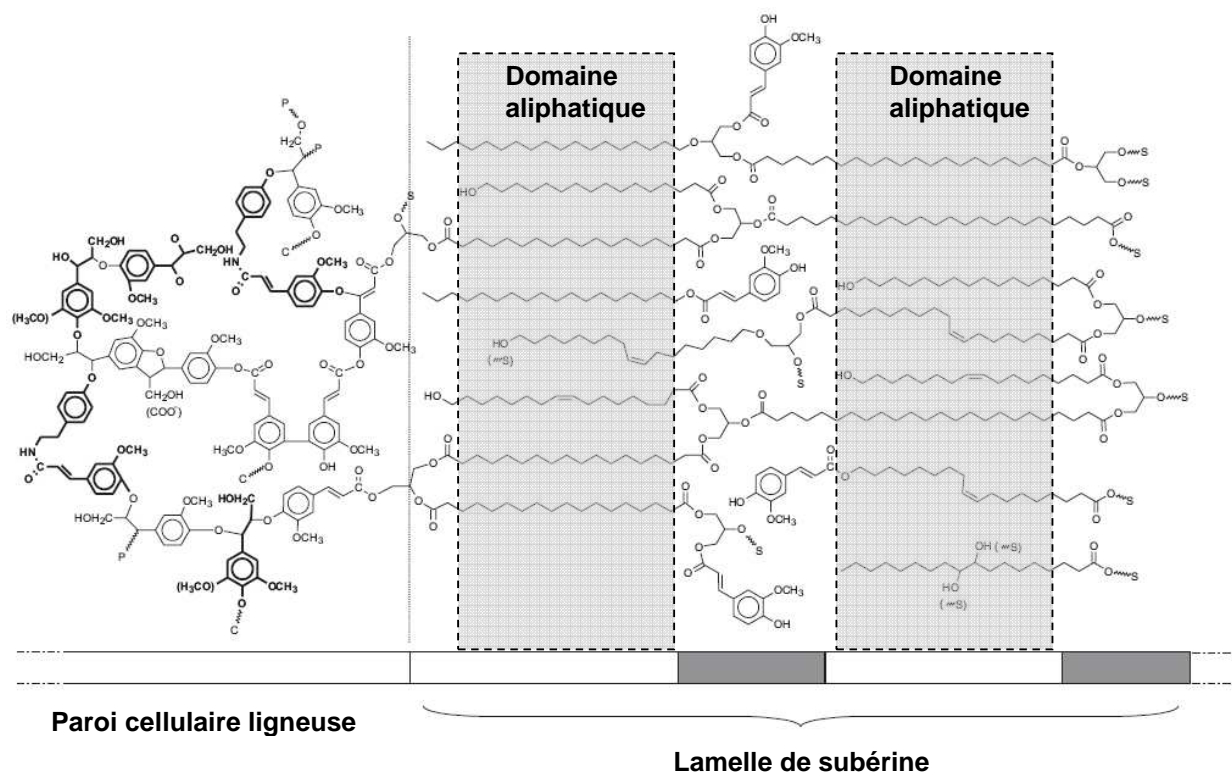


Fig. 11. Structure chimique de la subérine. D'après [Bernards, 2002](#).

La famille des acides phénoliques est traditionnellement subdivisée en 2 classes, celles des acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques, bien que certains acides phénoliques ne

puissent être classés par cette taxonomie, comme c'est notamment le cas de l'acide ellagique (représenté sous forme de lactone), voire de l'acide rosmarinique (**Fig. 12**).

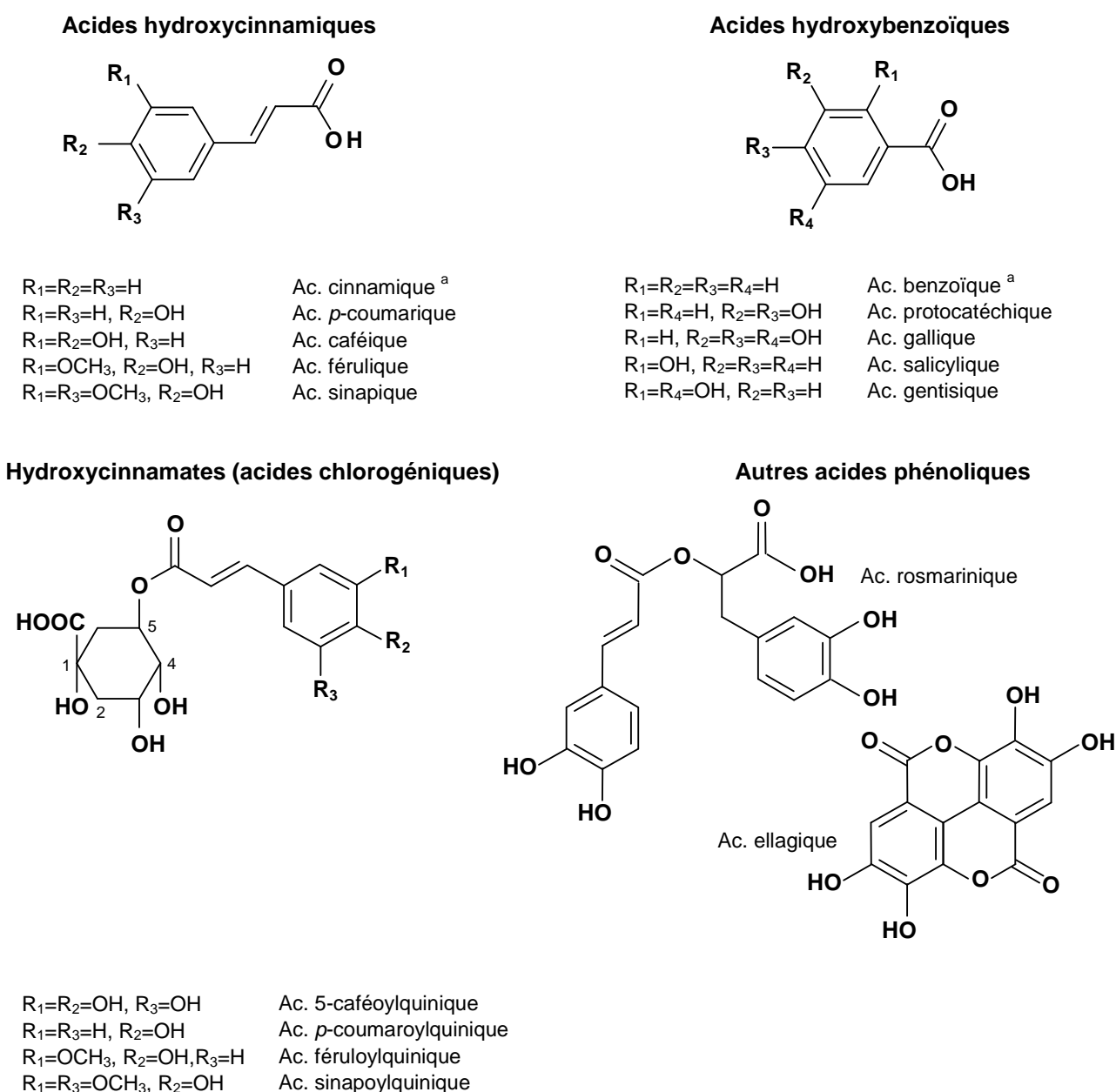


Fig. 12. Structure chimique des principaux acides et esters phénoliques issus du règne végétal
^a Ne sont pas des composés phénoliques

Parmi les acides hydroxycinnamiques, l'acide caféique a une répartition quasi-universelle chez les végétaux où il est présent sous forme d'esters 3-, 4- et 5-caféoylquiniques (également connus sous le vocable générique d'acides chlorogéniques) (**Fig. 12**) notamment dans la pomme, le café et les artichauts (Macheix *et al.*, 2006). On le retrouve également sous la forme d'acide caféoyltartrique (appelé acide caftarique) dans le raisin, d'acide

caféoylshikimique dans la datte, d'acide caféoylmalique dans le radis, de verbascoside dans l'olive et les feuilles d'olivier, d'esters dicaféoylquiniques (appelés acides isochlorogéniques), de caféoylglucose, de caféoylputrescine, etc. L'acide rosmarinique peut lui-même être considéré comme un ester particulier d'acide caféique. Enfin, les acides férulique et coumarique sont souvent liés aux arabinoxylanes pariétaux chez les végétaux.

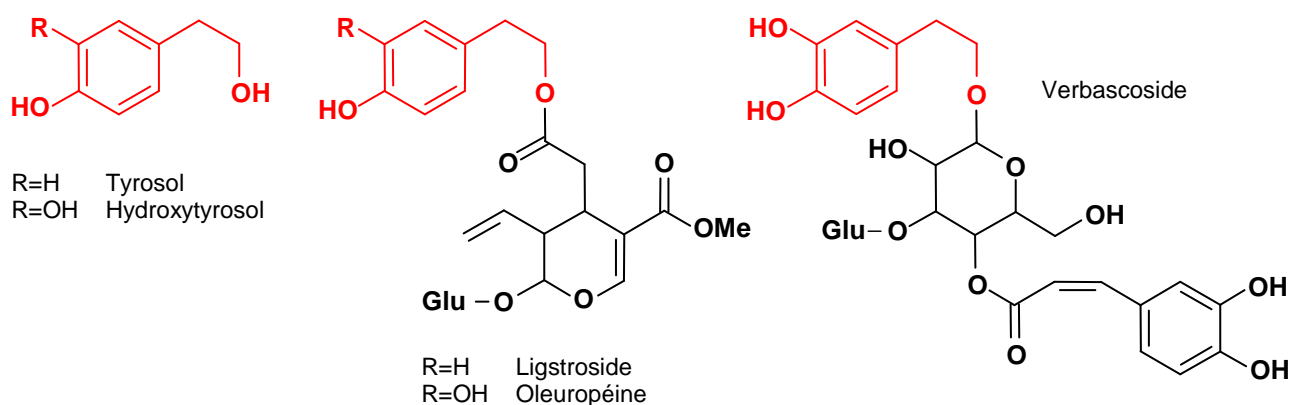


Fig. 13. Structure chimique de quelques alcools phénoliques et sécoiridoïdes issus du règne végétal.

La famille des flavonoïdes renferme, quant à elle, plusieurs milliers de molécules réparties en plus de dix classes, notamment celles des flavones, des flavonols, des flavanols, des isoflavones et des anthocyanes (formes glycosylées des anthocyanidines) (**Fig. 14**), qui diffèrent entre elles par la structure et le degré d'oxydation de l'hétérocycle central (ou cycle C), ainsi que par la nature de ses connexions avec les cycles A et B. Notons qu'exceptionnellement, le groupement central de la molécule peut ne pas être cyclisé (cas des chalcones et molécules voisines) ou se présenter sous la forme d'un cycle ne comportant que cinq sommets (cas des aurones) (Macheix *et al.*, 2006). Au sein de chacune des classes, les variations autour de la structure de base (flavane) portent principalement sur (i) le nombre et la position des hydroxyles aromatiques, (ii) le degré de méthylation, et (iii) le niveau, les sites et la nature des glycosylations. Ainsi, dans les végétaux, les flavonoïdes sont le plus souvent présents sous formes glycosylées, ce qui est supposé les protéger de leur propre dégradation et réduire leur toxicité pour la plante (Jones et Vogt, 2001). D'une manière générale, l'ose est lié au flavonoïde par l'intermédiaire d'une liaison *O*-glycosidique. Dans quelques cas plus rares, la liaison est de type *C*-glycosidique comme pour l'isoflavone puerarine (**Fig. 14**). La nature des sucres se liant aux flavonoïdes est variée, allant de la plupart des oses (glucose, galactose, arabinose, rhamnose) à des diholosides ou des formes plus complexes. Ainsi, la quercétine présente plus de 80 formes glycosylées. Dans le cas

singulier des flavanols, l'acide gallique peut estérifier la fonction 3-hydroxyle présente sur l'hétérocycle C, conduisant à la formation d'épicatéchine gallate, de catéchine gallate, d'épigallocatechine gallate et de gallocatechine gallate. Enfin, comme le souligne [Cheynier \(2005\)](#), la plupart des études portant sur la composition flavonoïdique se focalise sur des classes spécifiques de molécules facilement séparables et analysables, négligeant de ce fait les formes polymériques, beaucoup plus complexes à analyser, comme c'est le cas notamment des procyanidines (**Fig. 14**).

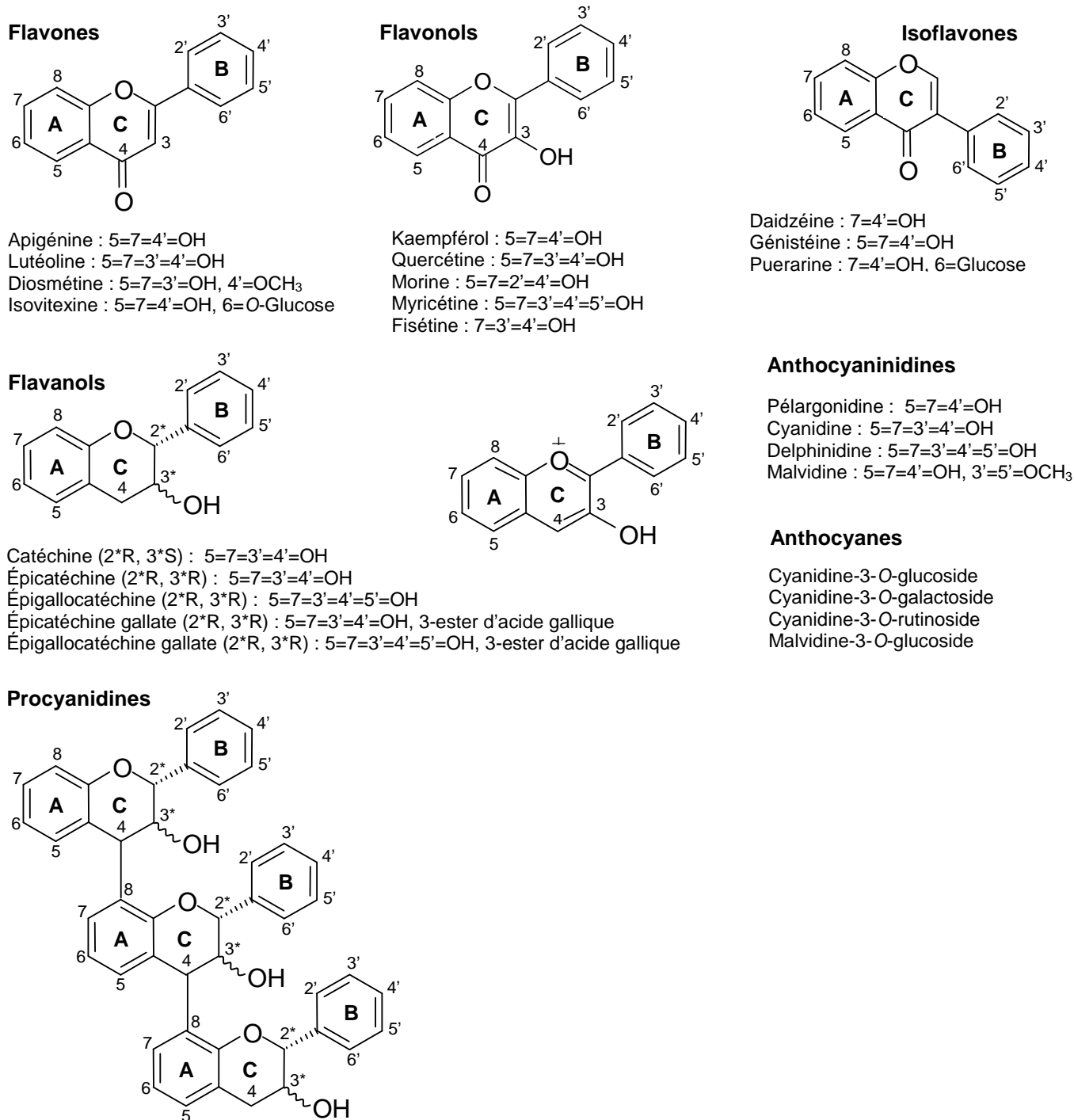


Fig. 14. Structure chimique des principaux flavonoïdes du règne végétal

De manière générale, l'organisme humain ne synthétise pas ce type de composés phénoliques (acide phénoliques, sécoiridoïdes, flavonoïdes, ...) lesquels sont donc apportés par l'alimentation. Les composés phénoliques sont présents dans quasiment tous les produits végétaux comestibles. Citons par exemple les fruits rouges riches en flavonoïdes de type anthocyanes responsables de leur coloration. Les agrumes représentent, quant à eux, les seules sources importantes de flavanones, et de la même manière les isoflavones ne sont apportées que par le soja et quelques légumineuses. Citons également la famille des labiées (romarin, sauge, origan, mélisse, ...) riche en diterpènes tels que l'acide carnosique, le carnosol, le rosmadial et le rosmanol. Finalement, les fruits et les boissons comme le thé, le vin rouge et le café constituent les principales sources de composés phénoliques, devant les légumes frais, les légumes secs et les céréales (Manach *et al.*, 2006).

2.1.2.2. Aspects mécanistiques et cinétiques

D'un point de vue théorique, la capacité d'une molécule à céder un atome H par rupture homolytique peut être quantifiée par l'énergie de dissociation homolytique (*bond dissociation energy*, BDE) des liaisons (i) O-H pour les composés phénoliques, (ii) S-H pour les thiols et (iii) N-H pour les amines primaires. Plus la BDE d'un groupement comportant un H est faible, plus son caractère donneur d'atome H est élevé.

Concernant les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes (Figs. 14, 15), Bors *et al.* (1990) ont mesuré en condition basique la vitesse de réaction de second ordre entre les flavonoïdes et certaines espèces radicalaires comme HO•, *t*-BuO• (*tert*-butoxyle) et N₃• (radical azidyle) générées par radiolyse pulsée. Il s'est avéré que le déterminant structural majeur de l'activité antiradicalaire des flavonoïdes était le groupe 3',4'-dihydroxy (structure catécholique) sur le cycle B, qui constitue une cible privilégiée des radicaux libres. Dans une moindre mesure, les déterminants structuraux secondaires identifiés ont été (i) la conjugaison de la double liaison 2,3 de l'hétérocycle C avec la fonction 4-oxo du même cycle, qui est responsable de la délocalisation électronique depuis le cycle B, et (iii) la présence des groupes 5- et 7-hydroxyles sur le cycle A.

Par la suite, de nombreuses études *in vitro* mettant en œuvre des flavonoïdes, mais également des acides ou des esters phénoliques, sont venues confirmer que la présence d'une structure catéchol est un déterminant majeur de l'activité antioxydante en accord avec la faible BDE des groupements OH correspondants (Cos *et al.*, 1998 ; Foti *et al.*, 1996 ; Goupy *et al.*, 2003 ;

Jovanovic *et al.*, 1996 ; Pietta, 2000 ; Rice-Evans *et al.*, 1996 ; Van Acker *et al.*, 1996 a ; 1996 b).

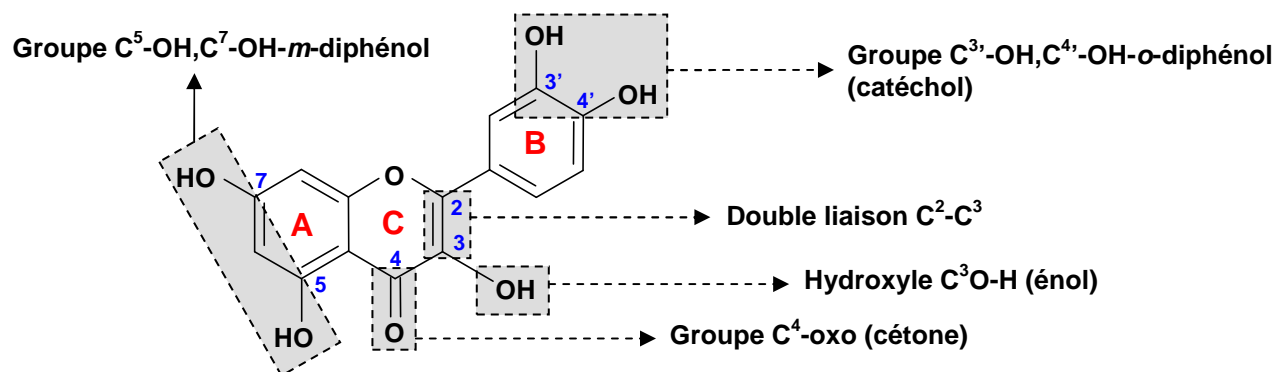


Fig. 15. Principaux déterminants structuraux de l'activité antiradicalaire des flavonoïdes

Ainsi, la BDE théorique (à 0 K) de la liaison OH du catéchol (~ 72 kcal/mol) est plus faible que celle du 2-méthoxyphénol (~ 74.3 kcal/mol), elle-même plus faible que celle du 1,3-dihydroxybenzène (~ 77 kcal/mol) (Dangles, 2006). L'une des hypothèses les plus courantes pour expliquer la prévalence de la configuration catéchol avance que lors de la rupture homolytique d'une liaison O-H, une liaison hydrogène intramoléculaire se forme entre le radical et l'hydroxyle adjacent, ce qui stabiliserait l'état radicalaire et par définition diminuerait la BDE ⁷ (Wright *et al.*, 2001 ; Santos et Simoes, 1998).

Cette explication doit néanmoins être nuancée par le fait qu'une structure pyrogallol (trois hydroxyles phénoliques vicinaux) constitue un réducteur plus puissant sur le plan théorique qu'une simple structure catéchol (deux hydroxyles phénoliques vicinaux), alors même que les composés pyrogalloliques sont généralement considérés comme des antioxydants plus faibles (Ou *et al.*, 2001). En témoignent les calculs établis par Thavasi *et al.* (2006) au niveau B3LYP/6-311G++(3df, 3pd) de la théorie de la fonctionnelle de la densité montrant que le pyrogallol présente une BDE (289,4 kJ/mol) inférieure à celle du catéchol (312,8 kJ/mol). Or, la question se pose de savoir pourquoi un composé basé sur une structure pyrogallol est à la fois plus réducteur et moins antioxydant qu'un composé basé sur une structure catéchol. Globalement, ce paradoxe met en lumière le fait, a priori surprenant, que la BDE et plus généralement la capacité réductrice peuvent dans certains cas jouer en défaveur de la capacité antioxydante. L'une des explications possibles serait, qu'en parallèle de la réduction d'espèces oxydantes comme les radicaux libres (effet positif sur la capacité antioxydante), un composé fortement réducteur est susceptible de réduire l'oxygène moléculaire pour former

⁷ Notons que l'établissement d'une telle liaison hydrogène est également à l'œuvre pour la structure de type pyrogallol (trois hydroxyles phénoliques vicinaux).

des EROs, ou bien encore de réduire les cations métalliques Fe^{3+} en Fe^{2+} (effets négatifs sur la capacité antioxydante). De ce point de vue, ce n'est pas tant la réactivité d'une molécule à céder un atome hydrogène ou un électron (réactions de réduction) qui impacte la capacité antioxydante, mais plutôt la nature de l'espèce qui subit la réduction. Dans cette optique, si l'espèce réduite concerne l'oxygène moléculaire ou un cation métallique de type Fe^{3+} , ou plus généralement toute espèce qui une fois réduite verra sa capacité à oxyder un substrat oxydable augmenter, alors l'effet d'une telle réduction sera pro-oxydant. En revanche, si l'espèce réduite devient moins sujette à oxyder un substrat oxydable, l'effet d'une telle réduction sera antioxydant. Ainsi, la capacité antioxydante n'est pas directement proportionnelle à la capacité réductrice, mais doit plutôt être considérée comme la résultante des différents effets (pro-oxydants *vs.* antioxydants) inhérents aux processus de réduction à l'œuvre dans un système donné. Sur ce dernier point, la même réaction de réduction peut avoir des effets diamétralement opposés suivant la composition et les conditions physico-chimiques qui règnent dans le système d'étude. En conséquence, il faut bien se garder de considérer les valeurs d'efficacité antioxydante comme des valeurs de portée universelle, valables pour tout type de milieu, de conditions d'oxydation et de substrat. En d'autres termes, il s'avère que parler de la capacité antioxydante sans mentionner le milieu, le substrat, les conditions d'oxydation, de température, de pH (s'il y a lieu), etc., n'a strictement aucune signification chimique.

Enfin, la capacité réductrice (exprimée par la BDE ou le potentiel d'ionisation des hydroxyles phénoliques) et la nature des espèces réduites ne sont pas les seuls facteurs à gouverner le caractère antioxydant dont le déterminisme est multifactoriel. En effet, un positionnement favorable et une bonne mobilité vers les sites de production des radicaux libres ou plus généralement des espèces oxydantes sont des attributs déterminants. D'autre part, la réactivité du radical issu de l'antioxydant vis-à-vis des lipides insaturés, des résidus amino-acides constitutifs des protéines, des glucides, ainsi que de l'ADN, est un paramètre à prendre en compte. Ce devenir est généralement gouverné par la capacité de l'antioxydant à stabiliser l'électron non apparié par délocalisation. De ce point de vue, la structure aromatique et la présence éventuelle de groupements encombrants confèrent aux radicaux phénoliques une bonne stabilité. *In vivo*, notons qu'il existe également des systèmes de régénération qui prennent en charge la réduction des formes radicalaires rémanentes, comme c'est le cas pour les tocophérols.

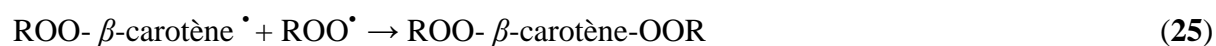
En marge des aspects purement mécanistiques, l'analyse cinétique des composés antioxydants permet de distinguer deux comportements d'antioxydation. Le premier concerne les antioxydants dits « *briseurs de chaîne* » lesquels se caractérisent par l'induction d'une phase de latence durant laquelle le substrat n'est pas notablement oxydé. Cette phase persiste tant que l'antioxydant n'est pas totalement consommé. Après la disparition complète de l'antioxydant, la vitesse de la peroxydation augmente très rapidement pour atteindre la même vitesse que lors de l'oxydation non inhibée. À l'opposé, le second comportement cinétique caractérise les antioxydants dits « *retardeurs* » lesquels réduisent le taux de peroxydation, sans induire de phase de latence distincte.

Les briseurs de chaîne naturels les plus puissants connus à ce jour, appartiennent sans conteste à la famille des tocots regroupant les tocophérols et les tocotriénols qui génèrent une phase de latence très distincte et réduisent deux peroxyradicaux dans le cas du vitamère α (Burton et Ingold, 1981; Niki *et al.*, 1984). Ceci souligne d'ailleurs le fait que malgré l'absence d'une structure catéchol, l' α -tocophérol présente des attributs physicochimiques qui lui confèrent une bonne capacité à réduire les radicaux lipoperoxytes, spécialement dans les milieux hétérogènes (émulsions, liposomes, LDLs, ...). Comme on peut le concevoir, la chaîne phytyle pourrait jouer un rôle central dans les propriétés antioxydantes des tocophérols par le biais d'une orientation et d'une intercalation dans les membranes phospholipidiques (mono- ou bicouche) ou tensio-actives dans le cas des émulsions.

En théorie, la vitamine C et les composés phénoliques semblent également capables de réduire directement les radicaux lipoperoxytes. Néanmoins, leur caractère hydrophile et leur éloignement des radicaux lipophiles semblent empêcher toute action directe par contact. Ainsi, il a été postulé que la vitamine C (ou l'ascorbate) intervenait plutôt au niveau de la régénération (réduction) du radical tocopheroxyl dérivé du tocophérol, produisant une synergie entre les deux molécules. Le cas des composés phénoliques est en revanche moins bien établi. Ces interactions de type tocophérol/ascorbate et tocophérol/composé(s) phénolique(s), de par l'importance qu'elles représentent, seront traitées spécifiquement.

Enfin, le transfert d'atome hydrogène à un radical libre, tel que LOO^\bullet , ou la régénération par réduction d'espèces antioxydantes capables de réaliser ce type de transfert direct, ne sont pas les seuls modes d'action des antiradicalaires. Sur ce plan, il semblerait que le mécanisme d'interruption de la lipoperoxydation en chaîne du β -carotène s'exerce *via* d'autres voies d'action, comme la formation d'adduits. En effet, bien que le transfert d'hydrogène du β -carotène au ROO^\bullet soit thermodynamiquement possible (Mortensen et Skibsted, 1998)

puisque la BDE du plus labile des hydrogène du β -carotène (309 kJ/mol) (Luo et Holmes, 1994) est inférieure à celle de l'hydrogène du ROO-H (370-380 kJ/mol), l'hypothèse selon laquelle le β -carotène exercerait son activité antioxydante *via* un mécanisme d'addition (réactions 24, 25) a été avancée par de nombreux auteurs (Burton et Ingold, 1984 ; Jørgensen et Skibsted, 1993 ; Kennedy et Liebler, 1992).



2.1.3. Piégeurs d'oxygène singulet

Les caroténoïdes sont, en l'état actuel de nos connaissances, les molécules les plus efficaces pour piéger $^1\text{O}_2$. La majorité des quelques 600 caroténoïdes présents dans la nature possède 40 atomes de carbone. Ils peuvent être classés au sein des hydrocarbures purs et être appelés carotènes (lycopène, β -carotène, ...) ou peuvent également posséder un groupement fonctionnel oxygéné et dans ce cas, s'appeler xanthophylles (astaxanthine, lutéine, ...) (Krinsky, 1998) (Fig. 16).

Liposolubles, ils sont en général facilement assimilables par les organismes. Ils appartiennent à la famille chimique des terpénoïdes, formés à partir de la polymérisation d'unités isoprènes. Il est généralement admis que les caroténoïdes suivent des voies métaboliques similaires à celles des lipides. Ils sont synthétisés par toutes les algues, toutes les plantes vertes et par de nombreux champignons et bactéries (dont les cyanobactéries). Il a été estimé que la nature produisait chaque année ~ 100 millions de tonnes de pigments caroténoïdes (Isler *et al.*, 1965). Ces molécules sont absorbées par les animaux dont l'homme sous forme alimentaire. Le β -carotène, par exemple, est présent dans les légumes frais comme les carottes, les patates douces, le cresson, le chou frisé et le persil, ainsi que dans les huiles végétales comme l'huile de palme à laquelle il donne sa coloration rouge. Citons également le poivron rouge riche en capsanthine (xanthophylle), le maïs en zéaxanthine et en cryptoxanthine (xanthophylle) et la peau de tomate en lycopène (carotène). Par ailleurs, la β -cryptoxanthine donne aux clémentines et aux mandarines leur couleur orange vif caractéristique, tandis que le lycopène détermine la couleur rouge de certains pomelos. Les crevettes, quant à elles, contiennent de l'astaxanthine naturelle issue de leur alimentation à base d'algues. Enfin, les saumons d'élevage tirent leur couleur rose d'astaxanthine artificielle, la couleur naturelle de la chair du saumon étant blanche par défaut.

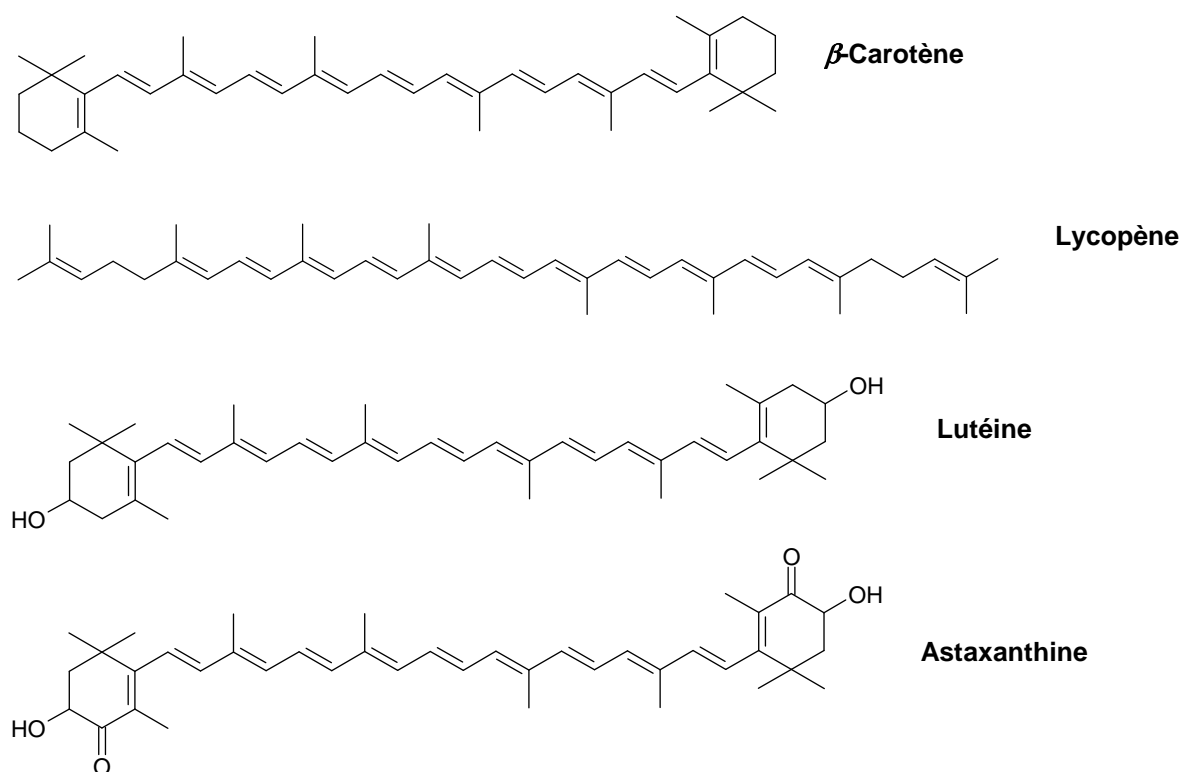


Fig. 16. Structure chimique de quelques caroténoïdes

Comme nous le verrons plus loin, les caroténoïdes, comme bon nombre d'antioxydants, exercent une activité antioxydante par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes distincts, bien que probablement complémentaires, i. e. briseur de chaîne et piègeur d' $^1\text{O}_2$; ce dernier mode d'action s'exerçant par la désactivation de $^1\text{O}_2$ en $^3\text{O}_2$ (**réaction 26**).



Grâce au long système polyénique conjugué de ces molécules, l'excès d'énergie de leur état excité ($\beta\text{-carotène}^*$) est dissipé au travers d'interactions vibrationnelles et rotationnelles avec le solvant ou leur environnement (Krinsky, 1998) (**réaction 27**).



Par ce mécanisme de dissipation de l'énergie sous forme de chaleur, le $\beta\text{-carotène}$ régénéré peut commencer un nouveau cycle de piégeage de $^1\text{O}_2$ et constitue par conséquent un piègeur non-stœchiométrique. Il est estimé que chaque molécule de caroténoïdes pourrait piéger environ 1000 molécules d' $^1\text{O}_2$ avant de réagir chimiquement et de former un produit.

A côté des caroténoïdes, il existe d'autres piègeurs d' $^1\text{O}_2$ parmi lesquels nous citerons plus particulièrement les tocophérols et les thiols. [Di Mascio *et al.* \(1990\)](#) ont ainsi étudié la capacité de certains antioxydants à piéger l' $^1\text{O}_2$ préalablement généré par la thermodissociation des endoperoxydes du 3,3'-(1,4-naphthylidène) dipropionate. Il s'est avéré que leur efficacité diminuait dans l'ordre suivant : lycopène, γ -carotène, bixine, zéaxanthine, lutéine, bilirubine, biliverdine, tocophérols et thiols. Ces auteurs soulignent cependant que les piègeurs les moins actifs sont ceux présents en plus grandes concentrations dans les tissus biologiques. Il en ressort que les caroténoïdes et les tocophérols contribueraient de façon équivalente à la protection tissulaire contre les effets délétères de l' $^1\text{O}_2$, puisque l'on estime que les tocophérols sont environ 30 fois plus abondants que le β -carotène *in vivo* ([Erhardt *et al.*, 2002](#)).

2.1.4. Chélateurs de métaux de transition

Les chélateurs d'ions de métaux de transition comme le cuivre et le fer peuvent prévenir l'oxydation en formant des complexes ou des composés de coordination avec les métaux. Il s'agit de protéines telles que la transferrine, la ferritine, la lactalbumine qui séquestrent le fer, ou encore la céruloplasmine et l'albumine qui séquestrent le cuivre ([Muggli, 1993](#)). Les polyphosphates, l'acide éthylènediamine-tétracétique (EDTA), l'acide citrique, les acides phénoliques et les flavonoïdes sont également connus pour leur capacité à chélater les métaux de transition. Chez les flavonoïdes, les trois « points d'attache » des ions de métaux de transition sont (i) la structure catéchol (3',4'-dihydroxy) du cycle B, et les structures (ii) 4-céto, 3-hydroxy ou (iii) 4-céto et 5-hydroxy du cycle C des flavonols ([Rice-Evans *et al.*, 1997](#)) (**Fig. 17**). De ce fait, la glycosylation de ces hydroxyles diminue le pouvoir chélateur des flavonoïdes.

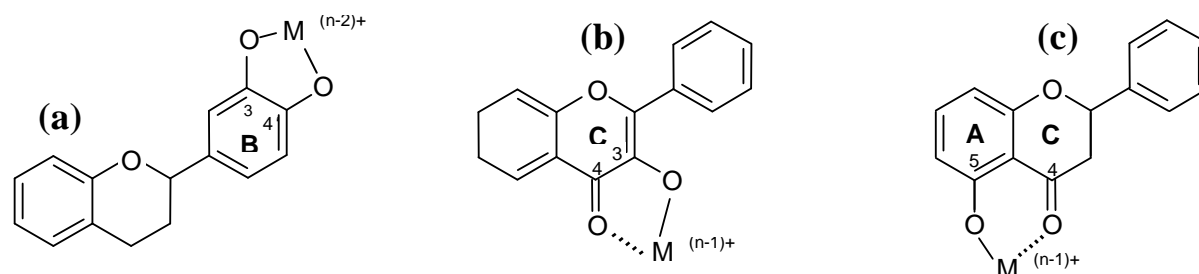


Fig. 17. Complexation d'ion métallique par les flavonoïdes via le groupe 3',4'-o-diphénol du cycle B (a), et les structures cétoniques, 4-céto, 3-hydroxy sur le cycle C (b) et 4-céto, 5-hydroxy sur les cycles A et C (c). D'après [Rice-Evans *et al.* \(1997\)](#).

La capacité des flavonoïdes à interagir avec les cations métalliques peut être mise en évidence au moyen de modifications spectrales induites par la complexation. Des effets bathochromes sont caractéristiques de la chélation du métal avec le composé. Plus le complexe est stable, plus le décalage vers les grandes longueurs d'onde sera important.

D'autre part, il semblerait que l'importance de ce type d'antioxydation dépende étroitement de la cible à protéger. Cependant, comme le reporte [Dangles \(2006\)](#), comparé à l'activité antiradicalaire par capture de EROs, ce mode d'action serait mineur pour l'inhibition de la peroxydation lipidique ([Van Acker et al., 1998 a](#)) mais dominant dans l'inhibition de la coupure oxydante des brins d'ADN ([Sestili et al., 1998](#)).

2.1.5. Effets pro-oxydants

Par définition, tout antioxydant est un composé réducteur, l'inverse n'étant pas nécessairement vrai. En effet, la capacité réductrice d'une molécule peut certes jouer en faveur de la capacité antioxydante par la réduction d'espèces oxydantes (comme les radicaux libres), mais peut également induire un effet pro-oxydant. C'est la balance entre ces deux processus aux effets diamétralement opposés qui va déterminer la capacité antioxydante d'une substance. Se pose alors la question du mécanisme par lequel une réaction de réduction peut induire un effet pro-oxydant. Parmi les plus connus, nous pouvons citer la réduction de l'oxygène moléculaire en espèces réactives de l'oxygène, ou bien encore la réduction du cation Fe^{3+} en réactant de Fenton (**réaction 5**) de type Fe^{2+} .

Actuellement, il est bien établi que les flavonoïdes peuvent exercer un effet pro-oxydant en présence de Cu^{2+} . Pour une classe de flavonoïdes présentant le même motif structurel de base, il s'est avéré que l'activité pro-oxydante vis-à-vis d'une protéine végétale (β -phycoérythrine) mise en solution aqueuse à 37°C augmentait avec le nombre d'hydroxyles aromatiques ([Cao et al., 1997](#)). Or, les flavonoïdes les plus oxydants en présence de Cu^{2+} , étaient en revanche les plus antioxydants en présence (i) d'un initiateur de peroxyradicaux (absence de Cu^{2+}) ou (ii) d'un système de Fenton ($\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$) générant HO^\bullet . Ce résultat est à mettre en relation avec certaines études montrant qu'en présence de métaux de transition, certains flavonoïdes (quercétine, myricétine et kaempférol) sont susceptibles d'induire une lipoperoxydation ainsi que des dommages à l'ADN nucléaire ([Sahu and Gray, 1993 ; 1994 ; Rahman et al., 1992 ; Ahmad et al., 1992](#)). De manière similaire, [Maiorino et al. \(1993\)](#) ont montré que, lors de la peroxydation de micelles de palmito-linoléoyl phosphatidylcholine (PLPC) induite par Cu^{2+} , l'addition d' α -tocophérol s'accompagne d'une

accumulation drastique des hydroperoxydes de PLPC. Selon ces auteurs, l'effet pro-oxydant de l' α -tocophérol pourrait provenir en grande partie de sa capacité à réduire Cu^{2+} en Cu^+ . En effet, la réaction entre les hydroperoxydes de phospholipides et Cu^{2+} génère des peroxyradicaux, tandis que celle avec Cu^+ produit des alcoxyradicaux (Erben Russ *et al.*, 1987). Cependant, il est connu que les alcoxyradicaux sont bien plus réactifs que les peroxyradicaux pour arracher un atome d'hydrogène (Howard, 1972). Concernant l'acide ascorbique, il est bien connu qu'il agit plutôt comme un pro-oxydant que comme un antioxydant en présence d'ions de métaux de transition. Ceci est dû au fait que l'acide ascorbique réduit ces derniers ($\text{Me}^{(n+1)+} \rightarrow \text{Me}^{n+}$) et génère du peroxyde d'hydrogène par autoxydation, qui génère à son tour, par réaction de Fenton, des hydroxyradicaux (Retsky *et al.*, 1993). Enfin, les caroténoïdes sont également susceptibles d'exercer une action pro-oxydante sous la dépendance de la pression en oxygène. D'après Burton et Ingold (1984), le β -carotène se comporterait comme un antioxydant piègeur de radicaux libres, seulement lorsque la pression partielle en oxygène est inférieure à 150 torrs (la pression normale de l'oxygène de l'air). En revanche, lorsque la pression s'élève, le β -carotène perdrait son activité antioxydante et exercerait un effet pro-oxydant autocatalytique d'autant plus important que sa concentration est élevée.

2.2. EFFETS SYNERGIQUES, ANTAGONISTES ET ADDITIFS

La synergie peut être définie comme le phénomène par lequel plusieurs composés présents dans un même système exercent un effet plus marqué que la somme des effets mesurés séparément sur les substances individualisées dans des systèmes de tests indépendants. L'antagonisme et l'additivité pouvant se définir en substituant le mot « plus » par « moins » ou « aussi », respectivement. Dans un premier temps, (i) la régénération d'antioxydants très actifs par des antioxydants moins actifs, ou encore (ii) l'interaction d'antioxydants exerçant leurs effets par des modes d'action différents mais complémentaires représentent les mécanismes synergiques les plus observés. En milieu multiphasique, l'interaction d'antioxydants de polarités différentes se distribuant par conséquent dans des phases ou des solvants différents est susceptible de créer une synergie. Parmi les multiples combinaisons possibles, nous nous focaliserons sur les couples α -tocophérol/acide ascorbique et α -tocophérol/composé(s) phénolique(s).

2.2.1. Combinaison d' α -tocophérol et d'acide ascorbique

Il y a plus de 60 ans, [Golumbic et Mattil \(1941\)](#) rapportaient que la vitamine C exerçait (dans le lard et l'huile de coton) une phase de latence plus importante en présence de tocophérols que ne le laissait supposer la somme de leur phase de latence mesurée individuellement, excluant donc un simple effet additif. Par la suite, [Tappel \(1968\)](#) fut le premier à suggérer qu'*in vivo* la vitamine C pouvait jouer le rôle de régénérateur d' α -tocophérols par réduction du radical tocophéroxyl, conduisant à un effet synergiste. Il fallu cependant une dizaine d'années supplémentaire pour que le phénomène de régénération puisse être démontré expérimentalement en solution organique (eau/isopropanol/acétone) ([Packer et al., 1979](#)).

Théoriquement, la réduction du radical α -tocophéroxyl par l'ascorbate est rendu possible par le faible potentiel réducteur du couple redox associant l'acide ascorbique et sa forme oxydée ($E^0 \sim 0.28$ V) par rapport à celui de l' α -tocophérol et du radical correspondant ($E^0 \sim 0.5$ V) ([Becker et al., 2004](#)). Cependant, le fait qu'il puisse exister un phénomène de régénération entre ces deux molécules, n'implique pas forcément l'existence d'une synergie. Cette question a partiellement été élucidée par [Niki et al. \(1985\)](#) en système modèle utilisant deux modes de génération de radicaux libres pour oxyder des liposomes de phosphatidylcholine de soja : (i) le 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochlorhydrique (AAPH) générant des ROO^\bullet dans la phase aqueuse et (ii) le 2,2'-azobis(2,4-diméthylvaléronitrile) (AMVN) dans la phase lipidique. Or, l'effet antioxydant du couple acide ascorbique/tocophérol s'est révélé plus puissant que la somme des effets mesurés individuellement (*synergie*) seulement lorsque l'AMVN était utilisé (ROO^\bullet lipophiles). Par contre, en présence d'AAPH (ROO^\bullet hydrophiles), l'effet antioxydant des deux molécules mesuré ensemble s'est révélé équivalent à la somme de leurs effets mesurés individuellement (*additivité*). Ce résultat montre qu'un mécanisme de régénération entre deux espèces induit un effet synergiste seulement si la molécule la moins puissante régénère la molécule la plus puissante. Ainsi, dans le milieu microsomial, la chaîne phytyle permettrait d'aligner l' α -tocophérol avec les chaînes acyles des acides gras de la bicouche phospholipidique, orientant par conséquent le noyau chromanol vers l'extérieur de la membrane (phase aqueuse à proximité de la membrane) ([McCay, 1985](#)) ; l'ascorbate étant quant à lui situé dans la phase aqueuse. Si le radical libre est généré dans la phase aqueuse (cas de l'AAPH), l'ascorbate tout comme la vitamine E pourra le piéger et le rendre indisponible pour oxyder les liposomes. Ce résultat implique une notion d'équivalence entre les deux molécules. Par contre, si le radical libre est généré dans la phase lipidique (cas de l'AMVN), seule la vitamine E pourra le réduire efficacement. Ainsi, dans ce cas

particulier, l'antioxydant le moins actif (ou mal situé, comme l'ascorbate) régénère l'antioxydant le plus actif (ou bien situé, comme la vitamine E), conduisant à un effet synergique. Se pose en revanche la question de savoir comment la vitamine E, dont l'action antioxydante est médiée par son groupement phénol situé dans la phase aqueuse, peut réduire un radical libre lipophile situé dans la phase lipidique. Probablement faut-il voir ici que ces localisations/compartimentalisations strictes sont des vues d'esprit ne tenant pas compte de la mobilité de la molécule et des radicaux libres à l'interface lipide-eau. D'autre part, ce résultat est à nuancer par le fait que [Halpner et al. \(1998\)](#) ont montré sur hépatocytes de rats en culture que la concentration en acide ascorbique diminuait en présence d'AMVN, suggérant de manière contre-intuitive qu'un antioxydant hydrophile pouvait réduire un peroxyradical lipophile.

En parallèle d'études en système microsomial, [Sato et al. \(1990\)](#) ont mis en évidence un mécanisme synergique *in vitro* entre les vitamines E et C dans les LDLs. L'éventuelle existence d'une telle synergie *in vivo* est importante puisqu'on estime qu'il y a dans les LDLs environ 7 molécules d' α -tocophérols (+ 2 autres antioxydants) pour protéger de l'oxydation 3070 lipides ([Esterbauer et al., 1993b](#)) et les résidus amino-acides de l'apolipoprotéine B100 (**Fig. 18**).

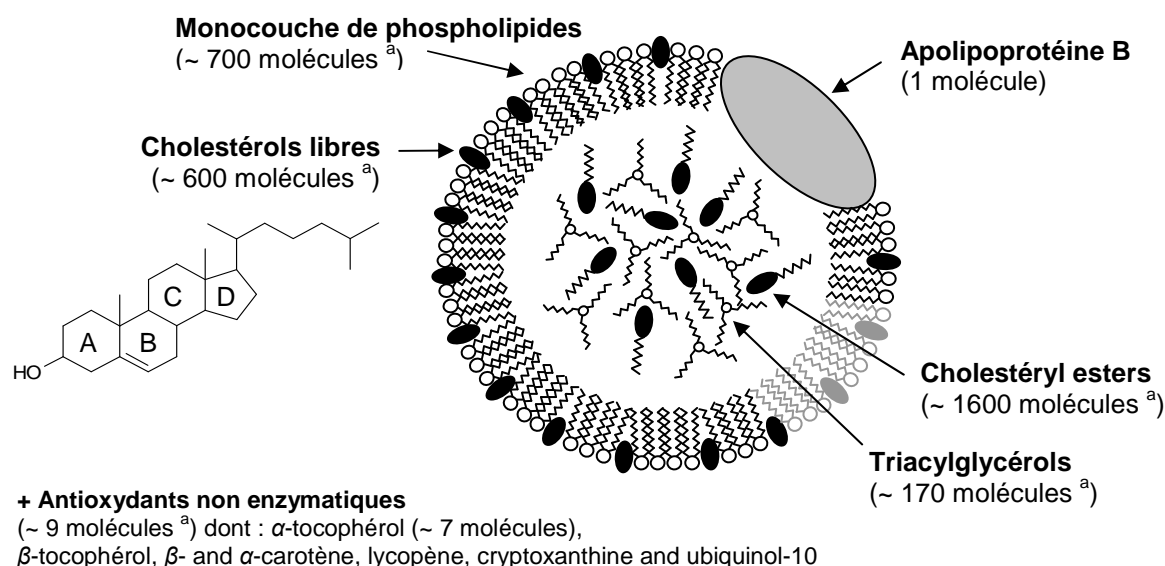


Fig. 18. Structure simplifiée de la particule de LDL. ^a D'après [Esterbauer et al. \(1993 b\)](#).

Si l'existence d'une régénération voire d'une synergie *in vitro* entre le tocophérol et l'acide ascorbique a pu être mise en évidence dans différents modèles, quid *in vivo* où coexistent une multitude de types tissulaires et cellulaires pluri-compartimentés ? Malgré quelques études contradictoires ([Burton et al., 1990](#)), un faisceau grandissant de preuves expérimentales

établies sur modèle humain (Jacques *et al.*, 1995) et animal (Chen *et al.*, 1980 ; Kanazawa *et al.*, 1981 ; Bendich *et al.*, 1984) montre qu'une supplémentation en vitamine C se traduit par une augmentation de la concentration en vitamine E dans les tissus concernés, selon des modalités qui restent à déterminer. En effet, l'acide ascorbique peut agir de deux manières distinctes : soit en régénérant l' α -tocophérol, soit en réduisant les EROs à la place de l' α -tocophérol. La régénération conduira (i) à un effet synergique si la molécule la moins puissante régénère la plus puissante, (ii) à un effet antagoniste si la molécule la plus puissante régénère la moins puissante ou enfin, (iii) à un effet additif (faible probabilité) si les deux molécules sont d'efficacité équivalente en termes de réactivité et de localisation. En revanche, une économie du tocophérol conduira forcément à un effet additif à long terme. Ceci signifie que l'observation d'effets synergique ou antagoniste est un indicateur de l'existence d'un phénomène de régénération.

Finalement, s'il existe des arguments expérimentaux supportant la thèse qu'une supplémentation en vitamine C permet d'augmenter la concentration en vitamine E, ceux-ci ne permettent pas de trancher quant au mode d'action mis en jeu (économie ou régénération) ni au type d'effet qui s'en suit (antagoniste, synergique, additif). Y répondre nécessite de mesurer l'activité antioxydante, ce qui peut s'avérer délicat. En effet, la diversité des substrats oxydables et des processus oxydatifs à l'œuvre dans l'organisme a conduit au développement d'une multitude de tests destinés à mesurer l'activité antioxydante, aucun d'entre eux ne présentant un caractère universel. À la difficulté initiale de la mise en évidence d'une interaction spécifique entre l'acide ascorbique et l' α -tocophérol, s'ajoute la difficulté de mesurer une activité antioxydante, en limitant les biais possibles. Parmi les études entreprises dans ce but, citons l'étude de Jialal et Grundy (1993) montrant que l'effet combiné d'une supplémentation en α -tocophérol, en ascorbate (et en β -carotène) n'induit pas de ralentissement significatif de l'oxydation de LDL, comparée à une simple supplémentation en α -tocophérol. Plus récemment, Huang *et al.* (2002) ont observé sur 184 sujets non-fumeurs que l'apport simultané des vitamines C et E n'apportait pas d'amélioration de l'activité antioxydante par rapport à une prise séparée. Enfin, sur des perches jaunes (*Percea flavescens*), Lee et Dabrowsky (2003) n'ont pas observé d'effet synergique avec les deux antioxydants. À l'opposé, une étude sur modèle humain impliquant des sujets âgés, a montré qu'une supplémentation combinée en vitamines C et E exerçait un effet synergique par abaissement des substances réagissant à l'acide thiobarbiturique dans le sérum (Wantanowicz *et al.*, 1984). D'autres études *in vivo* viennent en appui à l'existence d'un effet synergique

permettant de contrer la peroxydation lipidique dans les tissus vasculaires (Mezzetti *et al.*, 1995).

Finalement, il y a 50 ans, Tappel a suggéré l'existence d'un mécanisme régénératif *in vivo* entre l' α -tocophérol et l'acide ascorbique, se traduisant par un effet synergique. Or, malgré les nombreux efforts apportés pour valider (ou invalider) cette hypothèse, l'intuition de Tappel reste à confirmer expérimentalement.

2.2.2. Combinaisons d' α -tocophérol et de composés phénoliques

La place des composés phénoliques dans les processus de régénération et de synergie vis-à-vis du tocophérol est moins documentée que celle de l'acide ascorbique et de ses dérivés, probablement en raison du fait que les composés phénoliques regroupent une multitude de structures différentes.

Zhu *et al.* (2000) ont montré que l'addition de flavonols à une suspension aqueuse de LDLs oxydés par de l'AAPH s'accompagnait d'une moindre consommation d' α -tocophérol. L'allure des courbes suggère d'ailleurs une régénération plutôt qu'une économie des tocophérols puisque l'addition de flavonols (surtout pour les plus fortes concentrations, 20 μ M) semble restaurer la concentration initiale de tocophérols. Sur le plan structural, Zhu *et al.* (2000) ont également montré que le groupe catéchol du cycle B est de prime importance pour régénérer l' α -tocophérol puisque parmi les quatre flavonols testés (kaempférol, morine, myricétine et quercétine) (Fig. 14), la quercétine, qui est le seul flavonol à comporter une telle structure, a été le meilleur régénérateur. Dans une autre étude réalisée sur des sujets non-hypercholestérolémiques et non-hypertriglycéridémiques, Cartron *et al.* (2001) ont montré que l'oxydation induite par Cu^{2+} de LDLs incubés soit avec de l'acide caféique soit avec des composés phénoliques (de vin rouge) conduisait à un ralentissement de la consommation des tocophérols. De manière intéressante, il est apparu que la production des diènes conjugués débutait lorsque l' α -tocophérol était complètement oxydé, suggérant que cet antioxydant piège les radicaux propagateurs LOO^{\bullet} .

Concernant les effets de la combinaison sur l'activité antioxydante globale, Hirano *et al.* (2001) ont montré, lors de l'oxydation de LDLs induite par MeO-AMVN, que l'addition de flavonoïdes permettait de restaurer la phase de latence, supposée être induite par l' α -tocophérol. Sur la base de ces résultats, Hirano *et al.* ont conclu que les flavonoïdes agissent en tant que donneurs d'hydrogène aux radicaux tocophéroxyles. Dans une étude

réalisée en solution *t*-butanolique de linoléate de méthyle oxydé par du 2,2-azobis-isobutyronitrile (initiateur azo lipophile), [Pedrielli et Skibsted \(2002\)](#) ont, pour leur part, constaté que la quercétine et l'épicatéchine agissaient synergiquement avec l' α -tocophérol, sans toutefois proposer un mécanisme précis. À l'opposé, [Peyrat-Maillard *et al.* \(2003\)](#) ont montré que l'association de tocophérols et de composés phénoliques, comme les acides caféique et rosmarinique, conduit à un antagonisme lors de l'oxydation d'une dispersion aqueuse d'acide linoléique induite par AAPH. Les auteurs expliquent cet antagonisme par le fait qu'une fraction de ces acides (très actifs) servirait à régénérer l' α -tocophérol qui est moins actif. Enfin, [Goupy *et al.* \(2007\)](#) ont montré, lors de la peroxydation d'acide linoléique induite par metmyoglobine, que l' α -tocophérol et la quercétine exerçaient sur la formation des diènes conjugués une inhibition supérieure à celle déduite d'une simple hypothèse d'additivité, traduisant très clairement un effet synergique. Comme nous l'avons abordé plus haut, la synergie (tout comme l'antagonisme) est davantage compatible avec une régénération qu'avec une simple économie temporaire d'un antioxydant par l'action préférentielle d'un autre. Cherchant à établir le sens de cette régénération, [Goupy *et al.* \(2007\)](#) ont avancé l'hypothèse que l' α -tocophérol régénérerait la quercétine et non l'inverse. Pour cela, les auteurs se sont basés sur le fait que la quantité d' α -tocophérol était plus faible lorsque la quercétine était présente dans le milieu et, qu'en corollaire, la concentration de quercétine était plus élevée lorsque l' α -tocophérol était présent. Plus précisément, ces auteurs ont suggéré qu'il est plus probable que l' α -tocophérol régénérerait un produit d'oxydation de la quercétine, puisque la quantité de quercétine épargnée par l' α -tocophérol reste modeste en comparaison de l'augmentation de la consommation de l' α -tocophérol induite par la présence de quercétine. Sachant que ce(s) produit(s) d'oxydation conserverai(en)t une partie du potentiel antioxydant de la quercétine, ce mécanisme pourrait avoir une répercussion biologique importante. En outre, du fait que la régénération de la quercétine ou de ses produits d'oxydation par l' α -tocophérol n'est pas favorable, en termes de potentiel redox et de BDE, ces auteurs ont postulé que cette régénération pourrait être indirecte et impliquer le noyau porphyrine comme intermédiaire de transfert d'électron : l' α -tocophérol pourrait rapidement transférer un électron au radical cation porphyrine qui donnerait en retour un électron au(x) produit(s) d'oxydation de la quercétine, le(s)quel(s) pourrait enfin réagir avec les radicaux oxoferryles.

Il apparaît d'après ces études, que la nature de l'interaction entre l' α -tocophérol et les composés phénoliques peut se révéler complexe, étant dépendante du milieu (solution aqueuse, organique, milieu émulsionné, compartimenté, ...), des espèces initiant (métal de

transition, initiateur azo, hème protéique, ...) et propageant⁸ (radicaux lipoperoxydes dérivés du substrat lipidique) l'oxydation, et enfin du composé phénolique lui-même (acide, alcool ou ester phénolique, flavonol, flavanol, ...). De nombreuses données expérimentales tenant compte de toutes ces conditions devront encore être accumulées avant de pouvoir établir des scénarios plausibles.

⁸ Dans le cadre de l'autoxydation radicalaire lipidique.

3. MÉTHODES D'ÉVALUATION IN VITRO DE LA CAPACITÉ ANTIOXYDANTE

Le champ d'investigation qui s'offre à l'analyste désireux d'étudier les propriétés antiradicalaire et antioxydante est extrêmement vaste. La stratégie la plus simple consiste à mesurer la capacité d'un antioxydant à réduire un radical libre (par transfert d'hydrogène ou d'électron) ou un métal de transition (par transfert d'électron) en absence de substrat oxydable. Comme nous allons l'aborder ici, ces méthodes bien que plus simples à mettre en œuvre, présentent l'inconvénient de ne pas fournir de mécanisme compétitif entre l'antioxydant et le substrat oxydable pour réduire les espèces oxydantes, ce qui est grandement discutable en terme de représentativité du phénomène d'antioxydation naturel. Parmi ces méthodes dites *non-compétitives* (ou *directes*), nous aborderons plus particulièrement les tests basés sur des radicaux libres artificiels et stables tels que le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl et le radical cation dérivé de l'acide 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique.

À l'opposé de la stratégie *non compétitive*, l'approche dite *compétitive* (ou *directe*) implique l'utilisation d'un substrat oxydable et consiste à mesurer l'effet inhibiteur d'un antioxydant sur l'oxydation (artificielle ou naturelle) de ce substrat. D'un point de vue cinétique (et en éludant la mesure de la déplétion en oxygène), deux types de mesures peuvent être adoptés : (i) la mesure de la formation de produits d'oxydation ou (ii) la mesure de la disparition du substrat oxydable.

Même si cela relève d'une vue de l'esprit, la stricte dichotomie entre les méthodes *compétitives* et *non compétitives* sera appliquée dans ce chapitre par soucis de clarté.

3.1. MÉTHODES NON COMPÉTITIVES

3.1.1. Le test au radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

En 1958, Blois (1958) développe une méthode de mesure de l'activité antiradicalaire utilisant un radical libre artificiel et stable, le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]). Ce radical libre centré sur l'azote (**Fig. 19**) présente la particularité d'absorber dans le domaine visible à 510-520 nm.

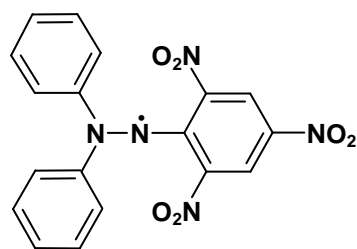


Fig. 19. Radical DPPH•.

Le principe général de ce test repose sur la chute d'absorption du DPPH• par piégeage de son état radicalaire par un antioxydant, (i) soit par *transfert d'électron* de l'antiradicalaire au DPPH• pour générer l'anion DPPH⁻ qui va ensuite capter un proton dans le milieu (**réactions 28-30**), (ii) soit directement par *transfert d'atome hydrogène* pour générer la molécule DPPH-H (**réaction 31**).



Cette méthode a par la suite été adaptée par de nombreux auteurs, parmi lesquels [Brand-Williams et al. \(1995\)](#) montrant que certains composés (principalement des acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques) réagissaient lentement avec le DPPH• (jusqu'à 6 h). Ce résultat souligne ainsi la nécessité d'atteindre un état stable lors de la prise en compte de paramètre stationnaire pour la détermination de la quantité d'antioxydant nécessaire à la réduction de 50 % du DPPH• initialement présent (EC₅₀) (**Fig. 20**). On peut toutefois s'interroger sur le fait que le calcul de l'EC₅₀ est un paramètre exclusivement stœchiométrique, ne tenant pas compte du temps mis par l'antioxydant pour réagir complètement avec le DPPH•. Dans cette optique, [Sánchez-Moreno et al. \(1998\)](#) ont proposé de prendre en compte la concentration d'antioxydant nécessaire pour réduire de 50 % le DPPH•, mais également, la durée nécessaire pour atteindre le plateau correspondant à la fin de la réaction entre l'antioxydant et le DPPH• pour la concentration EC₅₀ (AE = (1/EC₅₀) x TEC₅₀). Il s'agit ici d'une amélioration intégrant en une variable bidimensionnelle, le temps et le degré d'inhibition.

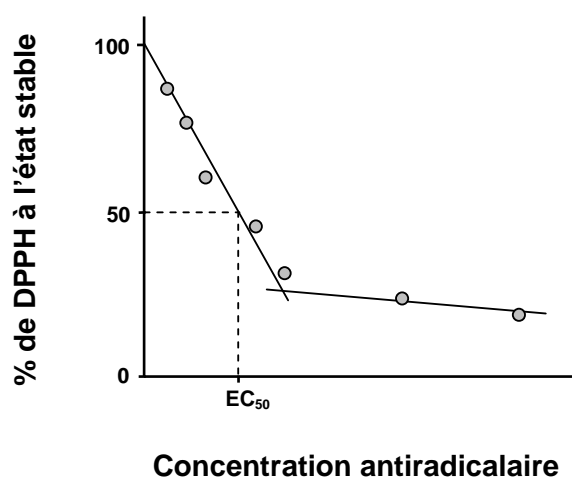


Fig. 20. Exemple de détermination de l'EC₅₀

Dans son article de revue, [Sánchez-Moreno \(2002\)](#) cite quatre-vingt références employant la méthode DPPH pour tester l'activité antioxydante de différents composés, extraits végétaux et produits alimentaires. À titre d'exemples, citons les travaux de [Silva *et al.* \(2000\)](#) sur des dérivés d'acide caféique, de [Brand-Williams *et al.* \(1995\)](#) sur des acides hydroxycinamiques et hydroxybenzoïques et enfin l'analyse cinétique de [Goupy *et al.* \(2003\)](#) sur des flavonoïdes et des acides phénoliques. Bien que ces études aient permis d'établir un classement en fonction de l'ordre d'efficacité antioxydante, l'utilisation de conditions expérimentales et d'expressions des résultats disparates limite les comparaisons aux seuls aspects qualitatifs. L'une des solutions de standardisation consisterait en l'utilisation systématique d'une molécule antioxydante de référence à laquelle serait rapportée l'activité antioxydante de la substance à tester. Pour ce faire, le Trolox a été proposé, bien que certains auteurs aient critiqué son utilisation ([Frankel et Finley, 2008](#)), sans toutefois proposer d'alternative. Malgré son aspect artificiel, le Trolox est, en effet, déjà largement employé dans d'autres tests, et qui plus est, présente une stœchiométrie avec le DPPH[•] bien connue (1 mole de Trolox piège 2 moles de DPPH[•]). Enfin, les différents modes d'extraction de l'information représentent également un frein à la standardisation des résultats. À titre d'exemple, certains auteurs déterminent un % d'inhibition à partir d'une concentration fixée, alors que d'autres déterminent une concentration (ou un ratio molaire antioxydant/DPPH[•]) pour un % d'inhibition fixé à 50 % (EC₅₀). D'autres encore ([Sanchez-Moreno *et al.*, 1998](#), [Kansci *et al.*, 2003](#)) incluent des paramètres cinétiques, ce qui permet d'ailleurs d'obtenir une information plus riche sur le comportement antioxydatif des substances testées.

Concernant les avantages, le test DPPH est l'un des plus faciles à mettre en œuvre, s'agissant d'un test non-compétitif n'utilisant pas de substrat oxydable. Il a de plus été combiné avec

une technique de séparation chromatographique sur couche mince (Glavind et Holmer, 1967). Cette approche implique une séparation chromatographique d'analytes en mélange sur plaque de silice, suivie d'une détection de l'activité de piègeurs de DPPH[•], après pulvérisation sur la plaque d'une solution alcoolique de DPPH[•] ; la détection étant visuelle ou chromamétrique selon les auteurs. Cette approche a notamment été appliquée sur des extraits végétaux pour détecter des composés individuels présentant une activité de piègeur de DPPH[•], (Cuendet *et al.*, 1997 ; Cavin *et al.*, 1998 ; Soler-Rivas *et al.*, 2000). Cependant, la principale limite de ces méthodes provient de la qualité de la séparation, puisqu'il n'existe malheureusement aucun mode de séparation générique apte à séparer tous les composés présents dans un extrait végétal, ni apte à avoir la même résolution entre différents extraits d'un même végétal. Constatant qu'une séparation satisfaisante ne pouvait pas être obtenue en phase normale (polaire), du fait de la nature polaire des composés phénoliques, Yrjönen *et al.* (2003) ont développé la même méthodologie sur des plaques de CCM en phase inverse (RP-18, silice greffée par des chaînes octadécyls). Les résultats sont relativement bien corrélés à la méthode DPPH spectrophotométrique de référence ($R^2 : 0,923$), bien qu'il semble difficile de se prononcer sur l'amélioration potentielle de la séparation, puisqu'un seul extrait a été étudié.

En termes d'inconvénients, Ozcelik *et al.* (2003) préconisent d'interpréter les résultats avec précaution puisque l'absorbance du radical DPPH[•] peut être diminuée par la lumière, l'oxygène, le pH, ainsi que par la nature du solvant. Notons également que la méthode DPPH n'est pas applicable à l'étude de la capacité antioxydante du plasma, puisque les protéines sont précipitées dans les milieux alcooliques. Enfin, la méthode DPPH telle que réalisée dans un milieu alcoolique a été critiquée d'un point de vue du mécanisme de réduction par transfert d'électron, suivie d'une protonation, ce qui n'est pas représentatif d'un phénomène oxydatif naturel par transfert d'hydrogène.

3.1.2. Radical cation dérivé de l'acide 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique

La première utilisation du radical cation dérivé de l'acide 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS) pour tester l'activité antioxydante, a été réalisée par Miller *et al.* en 1993. Cette méthode fut appelée capacité antioxydante en équivalent Trolox (TEAC) étant l'une des premières à utiliser le Trolox comme antioxydant de référence. On lui préfère maintenant le nom plus explicite de méthode à l'acide 2,2'-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique, ou méthode ABTS. La méthode originale fut basée sur

l'activation de la metmyoglobine par H_2O_2 (dans une solution de tampon phosphate) donnant naissance au radical ferrylmyoglobine, qui va par la suite oxyder l'ABTS en radical cation $\text{ABTS}^{+\bullet}$ (**Fig. 21**). Ce radical cation présente un spectre d'absorption avec un λ_{max} de 415 nm et des maxima d'absorption secondaire à 660, 734 et 820 nm ; propriétés spectrales qui sont perdues lorsque le radical cation est réduit par un antioxydant. Notons que la mesure est le plus souvent réalisée à 734 nm.

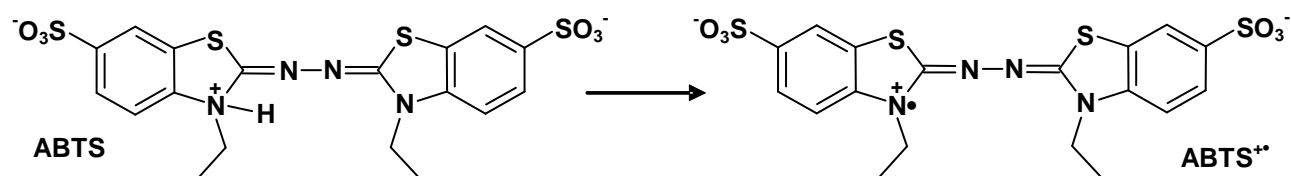


Fig. 21. Réaction de formation du radical cation $\text{ABTS}^{+\bullet}$ par oxydation de l'ABTS.

Cette méthodologie a été appliquée à l'étude de la relation existante entre la structure moléculaire et l'activité antioxydante de phénols substitués par différents groupements ainsi que de dérivés de flavonoïdes et de tocophérols ([Lien *et al.*, 1999](#)). [Rice-Evans *et al.* \(1996\)](#) ont d'ailleurs établi les principaux déterminants physico-chimiques gouvernant l'activité de réduction du radical cation $\text{ABTS}^{+\bullet}$ pour certaines familles de composés phénoliques. Pour les flavonols, il ressort qu'une substitution 1,2-dihydroxy sur le cycle B, et/ou la présence d'un hydroxyl en position 3 et d'une cétone en position 4 de l'hétérocycle C, sont des paramètres structuraux primordiaux. En revanche, pour les flavan-3-ols, une structure de type pyrogallol (3 hydroxyl phénoliques adjacents) sur le cycle B est plus avantageuse en termes d'activité antioxydante qu'une structure de type catéchol (toutes choses étant égales par ailleurs). La méthode ABTS a également permis de cribler l'activité antiradicalaire de très nombreux extraits végétaux ([Mantle *et al.*, 1998](#) ; [Ivanova *et al.*, 2005](#)).

La première question à se poser est de savoir si ce test implique une compétition entre l'ABTS et l'antioxydant pour réduire les radicaux ferrylmyoglobine⁹. Ici la séquence des opérations est primordiale quant au mécanisme (compétitif ou non) : si les substances antioxydantes sont additionnées après que le radical cation ait été formé par l'action combinée de la metmyoglobine et de l' H_2O_2 , alors il n'y aura vraisemblablement pas de compétition. En revanche, si toutes les espèces chimiques sont mises en commun, alors les radicaux ferrylmyoglobines pourront être réduits par l'antioxydant ou l'ABTS. Toutefois, le ratio molaire ABTS/antioxydant (150/0-2500 (μM)) est largement en faveur de l'antioxydant, selon

⁹ Dans ce cas, le test ABTS devrait être classé dans les méthodes compétitives.

les conditions fixées par Miller *et al.* (1993). Un autre aspect mécanistique concerne le mode de piégeage du radical cation ABTS^{•+} par des réducteurs puisque, selon Wolfenden et Wilson (1982), il impliquerait un transfert d'électron du réducteur au radical cation. Dans ce cas particulier, cette méthode mesure le pouvoir réducteur d'un composé et non son strict pouvoir antioxydant. Or, selon Prior et Cao (1999), un antioxydant est forcément un composé réducteur, l'inverse n'étant pas forcément vrai. D'autre part, la présence de trace de cations métalliques dans les fluides biologiques et les produits naturels vont inéluctablement réduire (par transfert d'électron) l'ABTS^{•+} en ABTS, faussant ainsi les résultats (Ou *et al.*, 2001).

3.2. MÉTHODES COMPÉTITIVES

De manière générale, les méthodes compétitives d'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante s'articulent autour de quatre composantes : (i) un substrat oxydable dont la dégradation oxydative peut être suivie par des méthodes physico-chimiques ou sensorielles, (ii) un milieu permettant la mise en contact des différentes composantes, (iii) des conditions d'oxydation permettant d'oxyder le substrat, ainsi que (iv) des substances antioxydantes dont on souhaite évaluer l'aptitude à protéger le substrat oxydable. Dans un tel système, la mesure du pouvoir antioxydant passe nécessairement par l'évaluation du degré d'oxydation du substrat lipidique. Une stratégie de mesure idéale consisterait à évaluer de manière fiable et rapide les meilleurs marqueurs de l'oxydation, en termes de spécificité et de représentativité du processus oxydatif. Cependant, toute la difficulté à mettre en œuvre une telle méthode repose sur la complexité des mécanismes d'oxydation et d'antioxydation.

Concrètement, l'évaluation de la capacité antioxydante d'une molécule vis-à-vis d'un substrat oxydable peut se baser sur deux stratégies de mesure cinétique différentes : (i) déplétion en oxygène et disparition du substrat, et (ii) apparition de produits d'oxydation (primaires, secondaires dans le cas de l'oxydation lipidique). Nous allons donc examiner dans ce chapitre les problèmes soulevés par cette évaluation et passer en revue, de manière non exhaustive, les tests les plus courants que nous classerons en fonction de la stratégie de mesure adoptée. Une mise en balance des avantages et inconvénients respectifs de chacune des méthodes abordées sera également proposée.

3.2.1. Déplétion en oxygène

L'étude cinétique de la consommation en oxygène dans un milieu donné et son allongement en présence d'agents antioxydants permet de mesurer la capacité de ces derniers à retarder

l'oxydation. Les méthodes de mesure peuvent être manométriques ou gravimétriques par mesure de l'augmentation du poids consécutive à la fixation d'oxygène sur le substrat oxydable. Il est également possible de mettre en œuvre la chromatographie d'espace de tête, en mesurant l'absorption d'oxygène à l'aide d'un détecteur de type thermoconductimètre (Wang *et al.*, 1991). La méthode polarographique qui emploie une électrode de Clark reste cependant la plus communément employée.

À titre d'exemple, Roginsky et Barsukova (2001) ont utilisé cette méthode pour étudier la consommation en oxygène induite par la peroxydation en chaîne de micelles de linoléate de méthyle en système aqueux, l'oxydation du substrat lipidique étant induite par le 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochlorhydrique (AAPH) qui est un initiateur azo générant des peroxyradicaux à température modérée. Cette procédure a été appliquée pour déterminer la capacité antioxydante de vins rouges et blancs, de bières, de cafés solubles et de thés noirs et verts.

Cependant, la principale limite de l'électrode de Clark tient au fait qu'elle consomme elle-même de l'oxygène ce qui biaise les résultats, d'autant plus considérablement que l'oxygène est présent en très faible quantité. C'est notamment pour pallier ces inconvénients qu'a été développée la mesure optique de la consommation en oxygène. Les sondes de mesure basées sur ce principe sont alors appelées optodes. Bien que différentes approches aient été développées, les optodes comportent bien souvent une membrane polymérique recouverte de fluorophores qui, une fois excités par une radiation (*via* une diode électroluminescente ou un laser), émettent une lumière de moindre énergie (phénomène de fluorescence) (Fig. 22a).

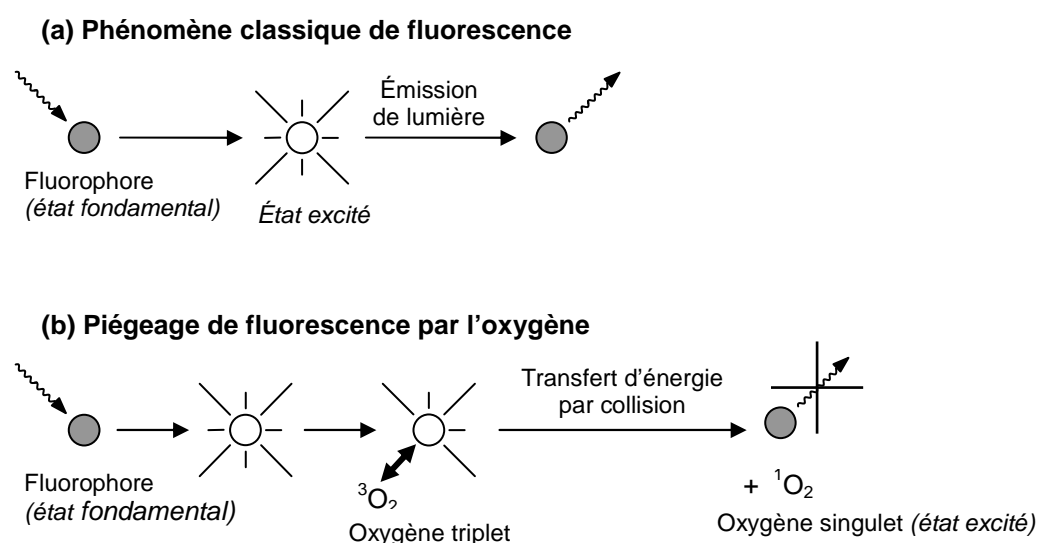


Fig. 22. Principe du piégeage de fluorescence par l'oxygène moléculaire.

Le principe de la mesure repose sur un piégeage dynamique de cette fluorescence par l'oxygène triplet. Ainsi, en présence d'oxygène, un transfert d'énergie a lieu entre le fluorophore excité et l'oxygène moléculaire, celui-ci transitant alors de son état fondamental (état triplet, $^3\text{O}_2$) à un état excité (état singulet, $^1\text{O}_2$) (**Fig. 22b**). En corollaire, le fluorophore n'émet pas de fluorescence, ce qui se traduit par une extinction de fluorescence (Ramamoorthy *et al.*, 2003). Une relation existe alors entre la concentration en oxygène et (i) l'intensité de fluorescence ou (ii) la durée de fluorescence. Ces optodes présentent un grand intérêt en tant qu'alternative à l'électrode de Clark puisqu'elles ne consomment pas d'oxygène. D'autre part, la possibilité d'utiliser des optodes à sonde déportée et miniaturisable confère à ces dernières une grande facilité d'utilisation associée à une amélioration de la résolution spatiale. Notons enfin qu'il existe des applications à haut débit, sur lecteur de microplaques.

3.2.2. Disparition du substrat

Cette stratégie de mesure est fréquemment employée pour l'établissement du degré d'oxydation en système modèle simple (i.e. substrat unique et parfaitement caractérisé) ou en système complexe marqué (particules biologiques ou cellules vivantes marquées par un fluorophore). En d'autres termes, cette stratégie n'est pas très souple puisqu'elle impose de travailler avec un substrat oxydable donné, tout en présentant par ailleurs de multiples avantages. Mises à part quelques méthodes chromatographiques destinées à doser les substrats non oxydés résiduels (Cuvelier *et al.*, 1990), les méthodes adoptant cette stratégie impliquent généralement une mesure spectrale. En effet, les substrats oxydables utilisés dans ces tests présentent en majorité une structure polyénique conjuguée qui leur confère des propriétés d'absorption et/ou de fluorescence dans le spectre UV-VIS et qui permet de suivre leur dégradation oxydative.

3.2.2.1. Méthodes utilisant la β -phycoérythrine

Largement basée sur la méthode de Glazer (Glazer, 1988 ; 1990), la méthode $\text{ORAC}_{\beta\text{-PE}}$ pour *oxygen radical absorbance capacity* développée par Cao *et al.* en 1993, utilise la β -phycoérythrine (β -PE) comme protéine cible de l'attaque des peroxyradicaux. Cette protéine fluorescente (λ_{ex} : 540/ λ_{em} : 565 nm) isolée à partir de *Porphyridium cruentum*, perd ses propriétés spectrales après une attaque radicalaire, permettant ainsi de suivre son oxydation par spectrofluorimétrie. L'effet protecteur d'un antioxydant est par la suite mesuré

par l'intermédiaire d'un calcul d'aire sous la courbe de l'antioxydant comparée à celle de l'oxydation non inhibée. Plus que l'aspect analytique du test, déjà développé dans le test de Glazer (Glazer, 1988 ; 1990), ce type de calcul qui prend à la fois en compte le temps et le degré d'inhibition constitue la véritable innovation de la méthode $ORAC_{\beta-PE}$, et va être intensivement repris par les nouvelles méthodes de mesure de l'activité antioxydante adoptant une approche compétitive basée sur la disparition du substrat.

La méthode $ORAC_{\beta-PE}$ a été appliquée à la mesure de l'activité antioxydante de vins rouges et blancs (Sanchez-Moreno *et al.*, 2003), de canneberges (Wada et Ou, 2002), ainsi que de différents fruits et jus de fruits (Wang *et al.*, 1996 a). Au niveau moléculaire, Villaño *et al.* (2005) ont montré que la structure catéchol des acides hydroxybenzoïque et hydroxycinnamique, des flavonoïdes et des stilbènes était le déterminant majeur de l'activité antioxydante. La méthode $ORAC_{\beta-PE}$ a également été employée pour mesurer l'évolution de l'activité antioxydante du plasma sanguin humain suite à différents régimes alimentaires, et semble montrer une corrélation entre l'augmentation de la consommation en fruits et légumes et l'augmentation post-prandiale de la valeur $ORAC_{\beta-PE}$ du plasma (Cao *et al.*, 1998). Sur la base de leurs résultats, Cao *et al.* (1998) ont suggéré que les flavonoïdes seraient les principaux contributeurs de cette évolution. Citons également l'étude de Huang *et al.* (2002) sur l'activité antioxydante du sérum sanguin de sujets non-fumeurs, montrant que la combinaison des vitamines E et C n'améliore pas l'activité antioxydante du sérum en comparaison d'une prise séparée de ces vitamines.

3.2.2.2. Méthode utilisant la fluorescéine ($ORAC_{FL}$)

S'inspirant de la méthode $ORAC_{\beta-PE}$, Ou *et al.* (2001) développèrent une méthode de détermination de l'activité antioxydante basée sur les propriétés de fluorescence de sels disodiques de fluorescéine (FL)¹⁰. Cette sonde fluorescente (**Fig. 23**) émet vers 515 nm suite à une excitation vers 490 nm, mais perd ses propriétés spectrales une fois oxydée par des peroxyradicaux générés par l'AAPH en milieu aqueux tamponné (pH 7.4) ; cette chute de fluorescence étant enregistrée en fonction du temps dans un spectrofluorimètre à cuve (1 cm). Lorsqu'un antioxydant est ajouté, une réduction des peroxyradicaux a lieu, les rendant indisponibles pour oxyder la fluorescéine, ce qui se traduit par un ralentissement dose-dépendant de la chute de fluorescence. De manière analogue à la méthode $ORAC_{\beta-PE}$,

¹⁰ Par commodité, le sel disodique de fluorescéine sera ramené au vocable fluorescéine.

l'information est extraite par l'intermédiaire d'un calcul de l'aire sous la courbe et le Trolox est utilisé comme antioxydant de référence.

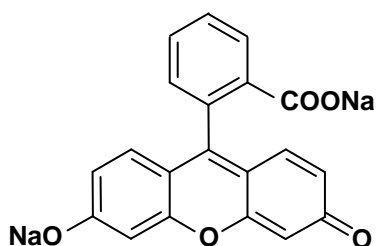


Fig. 23. Structure chimique du sel disodique de fluorescéine.

Globalement, le remplacement de la β -phycoérythrine par la fluorescéine permet de pallier certains problèmes de photodécoloration, d'interactions non-spécifiques avec des composés phénoliques, de coût et de reproductibilité. En effet, [Ou et al. \(2001\)](#) ont démontré qu'en absence d'AAPH, la fluorescence de la β -phycoérythrine n'était pas stable lorsqu'elle était seule ou en mélange avec certains composés phénoliques. D'autre part, d'après ces auteurs, 75 % du coût de la méthode $ORAC_{\beta-PE}$ sont imputables à la protéine fluorescente qui, en outre, présente une grande variabilité d'un lot à l'autre. La méthode $ORAC_{FL}$ a par la suite été adaptée à une mesure à haut débit en lecteur de microplaques ([Huang et al., 2002](#)).

En terme d'application à l'évaluation de l'activité antioxydante d'extraits végétaux, la méthode $ORAC_{FL}$ a été utilisée sur des composés issus d'extraits torréfiés de cafés verts de type Arabica et Robusta ([del Castillo et al., 2005](#)), sur des plantes amazoniennes utilisées dans la médecine traditionnelle ([Silva et al., 2007](#) ; [Souza et al., 2008](#)), sur des jus de fruits commerciaux ([Seeram et al., 2008](#)). Récemment, le fruit de *Euterpe oleraceae*, communément appelé *acai*, a suscité un intérêt exceptionnel, en raison de sa valeur $H-ORAC_{FL}$ qui est la plus élevée parmi les aliments et les extraits végétaux jusqu'à présent analysés par cette méthode ([Schauss et al., 2006](#)). Soulignons également le travail de [Ou et al. \(2002\)](#) qui ont analysé avec les méthodes $ORAC_{FL}$ et FRAP pour *ferric reducing antioxidant power*, 927 échantillons végétaux (111 de choux blanc, 59 de carottes, 51 de haricots verts, 57 de choux-fleurs, 33 d'oignons blancs, 48 d'oignons rouges, 130 de brocolis, 169 de tomates, 25 de betteraves, 88 de pois, 88 d'épinards, 18 de poivrons rouges, et 50 de poivrons verts) collectés sur divers marchés à différentes saisons de récolte. Tout d'abord, cette étude montre clairement la dépendance de la valeur ORAC à la variété, la localisation géographique ainsi que la saison de récolte. D'autre part, il est apparu qu'il n'existait pas de corrélation entre les résultats fournis par les méthodes FRAP et $ORAC_{FL}$, ce que les auteurs expliquent en

partie par des différences de mécanismes d'action antioxydante (transfert d'électron pour la méthode FRAP *vs.* transfert d'atome hydrogène pour la méthode ORAC_{FL}).

Concernant les inconvénients, notons que la méthode ORAC_{FL} telle que développée par [Ou *et al.* \(2001\)](#) permet seulement d'analyser les composés hydrophiles. Pour pallier ce désavantage, [Huang *et al.* \(2002\)](#) utilisèrent à la fois (i) des β -cyclodextrines aléatoirement méthylées et (ii) de l'acétone en faible proportion pour solubiliser les antioxydants lipophiles dans le tampon phosphate. De fait, il existe actuellement deux protocoles ORAC_{FL}, un pour tester les antioxydants hydrophiles (H-ORAC_{FL}, H pour hydrophile) et un autre pour tester des composés lipophiles (L-ORAC_{FL}, L pour lipophile). Dans le cas particulier du plasma sanguin, [Prior *et al.* \(2003\)](#) montrèrent que, puisqu'une extraction à l'hexane des composés lipophiles du plasma, avant analyse avec la méthode H-ORAC_{FL} n'altérerait pas la valeur H-ORAC_{FL}, les deux valeurs (H-ORAC_{FL} et L-ORAC_{FL}) pouvaient être additionnées et conduire à la valeur totale T-ORAC_{FL} prenant en compte l'ensemble des propriétés antioxydantes du plasma. Cependant, si ce raisonnement semble justifié d'un point de vue analytique, il est grandement discutable au regard des mécanismes complexes de l'activité antioxydante. Ainsi, le fait que les antioxydants lipophiles et hydrophiles ne soient pas analysés dans un même test suppose que leurs propriétés antioxydantes mesurées séparément dans des milieux différents peuvent être additionnées. Or, comme nous l'avons déjà montré, les antioxydants de polarités différentes peuvent agir par l'intermédiaire de mécanismes d'action synergique ou antagoniste. D'un point de vue opératoire, notons que cette démarche peut s'avérer particulièrement laborieuse. Se pose également la question de l'utilisation d'un émulsifiant destiné à solubiliser l'antioxydant, puisque dans les milieux hétérogènes comme les émulsions, l'émulsifiant sert à solubiliser le substrat lipidique (et non l'antioxydant). Plus fondamentale encore est la critique selon laquelle l'antioxydant est présent en très large excès (0.5-5 μ M) par rapport au substrat oxydable (63 nM), ce qui est irréaliste. En effet, ce test ne mesure pas une activité antioxydante au sens classique du terme, puisque selon la définition communément acceptée, un antioxydant est « une substance qui, *en faible concentration par rapport au substrat*, inhibe ou prévient l'oxydation de ce dernier » ([Halliwell et Gutteridge, 1995](#)). Malgré ces critiques, la méthode ORAC_{FL} est l'une des plus utilisées actuellement, à la fois (i) pour étudier la relation structure-activité de composés purs, (ii) pour tester le pouvoir antioxydant de différents extraits végétaux, et enfin (iii) pour analyser l'influence de certains régimes alimentaires sur les propriétés antioxydantes du plasma.

3.2.2.3. Co-oxydation du β -carotène et de l'acide linoléique

Cette technique de spectrophotométrie dans l'ultraviolet a initialement été développée par Marco (1968) puis légèrement modifiée par Miller (1971). Elle consiste à mesurer, à 470 nm, la décoloration du β -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique. La dispersion de l'acide linoléique et du β -carotène dans la phase aqueuse est assurée par un émulsifiant de type Tween, tandis que l'oxydation de l'acide linoléique est accélérée par la chaleur (50°C). L'addition d'antioxydants purs (Von Gadow *et al.*, 1997) ou sous forme d'extraits végétaux (Moure *et al.*, 2000 ; Koleva *et al.*, 2001) induit un retard de la cinétique de décoloration du β -carotène. Cette méthode est sensible, rapide et simple s'agissant d'une mesure spectrophotométrique dans le visible. Elle présente également l'avantage de pouvoir être couplée à la chromatographie sur couche mince (Pratt et Miller, 1984). Après séparation chromatographique d'un extrait naturel renfermant différents antioxydants, un mélange de β -carotène et d'acide linoléique est pulvérisé sur une plaque qui est alors exposée plusieurs heures à la lumière du jour ou aux UVs jusqu'à décoloration du fond jaune. Les bandes où la couleur jaune persiste, indiquent la présence de substances antioxydantes.

Cependant, l'oxydation induite par voie thermique est non contrôlée, ce qui conduit bien souvent à une variabilité des résultats. Pour contourner ce problème, certains auteurs ont remplacé la chaleur par des agents oxydants conduisant à des résultats plus reproductibles, comme l'AAPH (Parejo *et al.*, 2003) ou la lipoxygénase de soja (Chaillou and Nazareno, 2006). Cette méthode est d'autre part sujette au parasitage de composés absorbants dans la fenêtre spectrale du β -carotène. Frankel (1998) et Decker *et al.* (2005) ont également critiqué l'utilisation d'acides gras libres (AGLs) qui ne représentent pas des modèles lipidiques réalistes. En effet, les AGLs formeraient des micelles mixtes avec les antioxydants, dont le comportement vis-à-vis de l'oxydation est très différent de celui de gouttelettes d'huile naturelles. Enfin, l'interprétation des données n'est pas aisée car le β -carotène est lui-même un antioxydant, sensible à l'oxygène de surcroît.

3.2.2.4. Chute de fluorescence de l'acide *cis*-parinarique

En 1987, Kuypers *et al.* ont montré l'intérêt d'utiliser l'acide *cis*-parinarique (*c*-PnA) comme sonde fluorescente pour évaluer le degré de peroxydation lipidique en système membranaire. Le *c*-PnA ou acide 9-*cis*,11-*trans*,13-*trans*,15-*cis*(octadécatétraénoïque) est un acide gras polyinsaturé de la famille des ω -3 comportant quatre doubles liaisons conjuguées (Fig. 24).

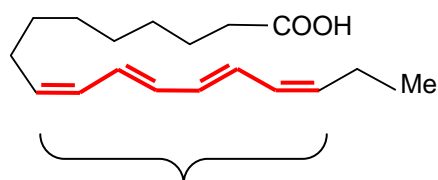


Fig. 24. Structure de l'acide cis-parinarique

Ce tétraène conjugué confère au *c*-PnA de fortes propriétés de fluorescence ($\lambda_{\text{ex/em}}$: 324/413 nm), ainsi qu'une sensibilité accrue aux attaques radicalaires par rapport à la plupart des acides gras polyinsaturés et de leurs dérivés. [Kuypers et al. \(1987\)](#) ont utilisé une longueur d'onde d'excitation de 324 et ont observé un maximum d'émission à 413 nm ce qui est très proche de la valeur reportée par [Sklar et al. \(1975\)](#) de 410 nm. Selon [Kuypers et al. \(1987\)](#), le maximum d'émission du *c*-PnA est indépendant de son environnement, bien que de légères variations ($\lambda_{\text{ex/em}}$: 326/420 nm) aient été trouvées pour le *c*-PnA en complexe avec l'albumine du sérum humain ([Osaka et al., 1997](#)). Le point essentiel est que la fluorescence du *c*-PnA est irréversiblement perdue lors de son oxydation, ce qui a conduit au développement de nombreux tests utilisant ce substrat.

Un des avantages du *c*-PnA est qu'il peut être intégré par voie métabolique aux structures membranaires de divers types cellulaires, permettant d'améliorer la sensibilité de détection des processus oxydatifs dans ces structures hautement organisées. De ce fait, le *c*-PnA a, entre autres, été utilisé pour mesurer la peroxydation lipidique dans les érythrocytes ([Van den Berg et al., 1988](#) ; [Simoes et al., 1992](#)), les particules sub-mitochondriales ([De Hingh et al., 1995](#)), le réticulum sarcoplasmique ([Dinis et al., 1993](#)), les macrophages ([McGuire et al., 1997](#)), les cardiomyocytes ([Steenbergen et al., 1997](#) ; [Drummen et al., 1999](#)) et certaines cellules leucémiques humaines ([Ritov et al., 1996](#)). Cette méthode a également été employée pour mesurer la capacité de différentes substances à protéger des LDLs ([Laranjinha et al., 1992](#)) ou des liposomes ([Tsuchiya et al., 1994](#)) marqués par de l'acide *cis*-parinarique. À titre d'exemple, [Osaka et al. \(1997\)](#) ont déterminé l'aptitude de l'amphotéricine B à contrer la peroxydation du *c*-PnA en complexe avec l'albumine de sérum humain ou incorporé dans des liposomes, l'initiation de l'oxydation du complexe étant assurée par l'AAPH et celle du système liposomal par le 2,2'-azobis(2,4-diméthylvaléronitrile) (AMVN). [Laranjinha et al. \(1994\)](#) ont, quant à eux, étudié en termes de relation structure-activité, la capacité antioxydante de différents composés phénoliques alimentaires vis-à-vis du *c*-PnA incorporé

dans des particules de LDLs et oxydé par de l'AAPH. Entre autres avantages, le *c*-PnA est bio-mimétique et ne perturbe pas la bicouche lipidique.

Il présente de plus un très large déplacement de Stokes¹¹ (~ 110 nm). En termes d'inconvénients, le *c*-PnA est sensible à l'air et est susceptible de se photodimériser sous la lumière d'excitation, ce qui entraîne une perte de fluorescence qui peut conduire à une surestimation du degré d'oxydation (Morgan *et al.*, 1980 ; Haugland, 1996 ; Naguib, 1998).

En outre, le *c*-PnA absorbe dans le spectre ultraviolet à 320 nm, fenêtre spectrale dans laquelle de nombreux composés et, en particulier, les flavonoïdes absorbent également. Concrètement, les résultats peuvent être faussés si la molécule interférente absorbe tout ou partie des photons d'excitation et/ou d'émission. Enfin, la longueur d'onde d'émission du *c*-PnA (~ 413 nm) est proche de celle des lipofuscines (~ 430-490 nm), ce qui peut occasionner des interférences considérables. En effet, en condition de stress oxydant, l'apparition de fluorescence concomitante à la formation de lipofuscines peut masquer la chute de fluorescence du *c*-PnA.

3.2.2.5. Cytométrie de flux et fluorescéines lipophilisées

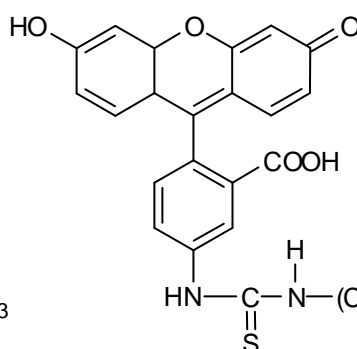
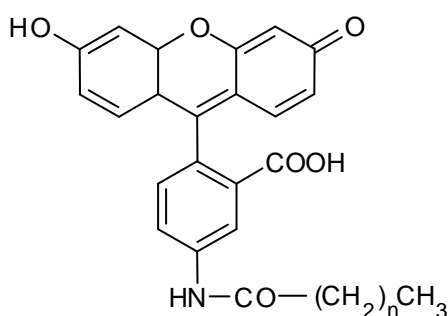
En partant du principe que la fluorimétrie permettait seulement d'étudier la peroxydation lipidique sur une large population cellulaire, sans donner accès à l'échelle de la cellule, Makrigiorgos *et al.* (1997) ont développé une méthode basée sur la cytométrie de flux. Pour cela, la 5-(N-dodécanoyl)aminofluorescéine (C11-fluor, **Fig. 25a**), un dérivé lipophile de la fluorescéine commercialement disponible, a été incorporée au sein de membranes d'érythrocytes. L'oxydation de la C11-fluor, induite par l'hydroperoxyde de cumène, s'accompagne d'une extinction graduelle de fluorescence. Dans ce test, l' α -tocophérol ou le Trolox (son équivalent hydrophile, **Fig. 10**) inhibent clairement la peroxydation lipidique lorsqu'ils sont incubés avec les cellules, comme en témoigne le ralentissement continu de la cinétique d'extinction de fluorescence. Cependant, la condition *sine qua none* pour une application courante de cette méthode à la détection de l'oxydation de sous-populations cellulaires spécifiques est que la sonde fluorescente ne soit pas échangeable d'une cellule à l'autre. En effet, si l'échange peut avoir lieu, la différence de peroxydation entre les cellules ne pourra pas être détectée. Dans cette optique, Maulik *et al.* (1998) ont examiné et comparé quatre fluorescéines lipophilisées : la C11-fluor, la 5-hexadécanoylaminofluorescéine

¹¹ Différence en longueur d'onde (ou en fréquence) entre la position du pic du spectre d'absorption et celle du pic du spectre d'émission de la même transition électronique.

(C16-fluor), la 5-octadécanoylamino fluorescéine (C18-fluor) et la dihexadécanoylglycérophosphoéthanolamino fluorescéine (fluor-DHPE) (**Fig. 25b**). Parmi elles, seule la fluor-DHPE s'est avérée être une sonde non-échangeable. Cette méthodologie a par la suite été appliquée à l'étude de l'efficacité antioxydante de l' α -tocophérol et des acides ascorbique et urique vis-à-vis des membranes cellulaires d'érythrocytes marqués au C11-fluor et oxydées par l'hydroperoxyde de cumène (Chung et Benzie, 2000). Les résultats indiquent que l' α -tocophérol est l'antioxydant le plus efficace, mais également que l'ascorbate stoppe la propagation radicalaire en chaîne qui, selon les auteurs, procède probablement d'un mécanisme de recyclage redox de l' α -tocophérol.

(a) Dérivés lipophiles de fluorescéine

$n = 10$ (C11-fluor) ; $n = 14$ (C16-fluor) ; $n = 16$ (C18-fluor)



(b) Dérivés phospholipidiques de fluorescéine

Fluor-DHPE

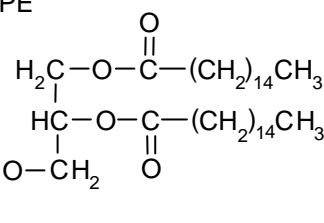


Fig. 25. Structure chimique des dérivés lipophiles (a) et phospholipidiques (b) de la fluorescéine.

En 2004, Amer *et al.* ont utilisé la fluor-DHPE pour marquer les membranes d'érythrocytes de donneurs normaux et de patients thalassémiques (maladie génétique liée à une déficience de la synthèse de l'hémoglobine). La mesure du degré d'oxydation induit par H_2O_2 a été réalisée par cytométrie de flux et a montré que les cellules des patients thalassémiques y étaient plus sensibles.

En termes d'avantages, la longueur d'onde d'excitation de ces sondes (488 nm) semble particulièrement bien adaptée à la fois aux cellules mais également à une utilisation courante en cytométrie de flux qui utilise généralement un laser émettant à cette même longueur d'onde. En outre, la fluor-DHPE mime relativement bien les lipides membranaires. Globalement, la méthode, en donnant accès à l'échelle de la cellule individuelle ou de la sous-population, est un outil certes coûteux et complexe à mettre en œuvre, mais particulièrement précieux pour les chercheurs. À notre connaissance, le seul inconvénient que l'on puisse relever est que cette méthode a été employée uniquement sur des érythrocytes

dans un nombre très limité d'études. Il serait souhaitable à l'avenir de confirmer que la fluor-DHPE est une sonde suffisamment sensible pour être utilisée avec d'autres types cellulaires.

3.2.2.6. Chute de fluorescence du BODIPY

Cette méthode fluorimétrique a été développée initialement en utilisant comme substrat oxydable, l'acide 4,4-difluoro-5-(4-phényl-1,3-butadiényl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacène-3-undécanoïque (C11-BODIPY^{581/591}) (Naguib, 1998). Cette sonde fluorescente (Fig. 26) au sein de laquelle le motif BODIPY est connecté au groupement phényle par l'intermédiaire d'un diène conjugué – qui agit comme un pont de résonance – exhibe une fluorescence rouge, caractérisée par une émission maximale dans la gamme spectrale de 591-595 nm.

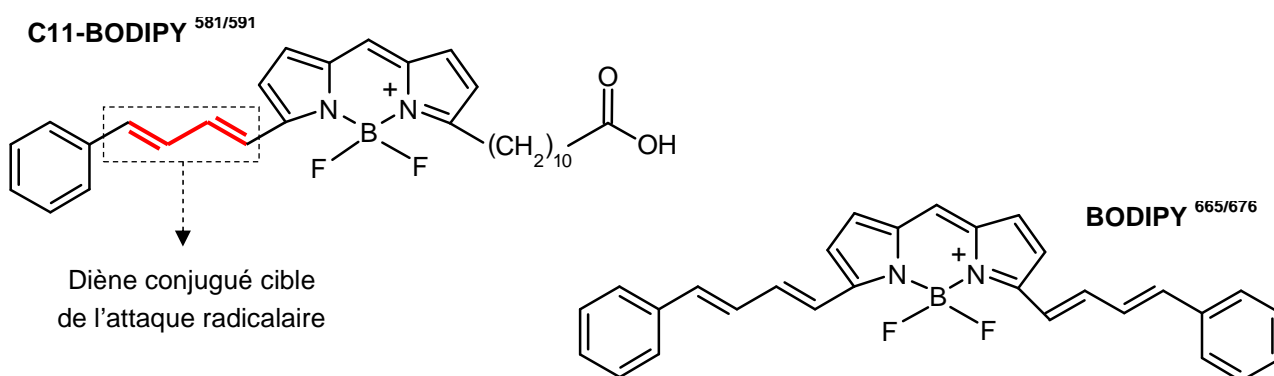


Fig. 26. Structure chimique des sondes fluorescentes C11-BODIPY^{581/591} et BODIPY^{665/676}.

Le nombre de doubles liaisons conjuguées rend ce substrat particulièrement oxydable par les peroxyradicaux. Il a été mesuré qu'en présence de ces derniers, la vitesse de réaction du C11-BODIPY^{581/591} était environ deux fois plus élevée que celle des lipides polyinsaturés. L'oxydation du C11-BODIPY^{581/591} se traduit par l'extinction progressive du signal fluorescent. Le principe de la méthode, telle que développée par Naguib (1998), consiste à évaluer la capacité de molécules antioxydantes à protéger le C11-BODIPY^{581/591} de l'attaque des peroxyradicaux générés par l'AMVN à une température avoisinant les 40°C. La capacité antioxydante se traduit alors par l'apparition d'une phase de latence plus ou moins marquée en fonction de la quantité d'antioxydants briseurs de chaînes. Pour cela, Naguib (1998) a utilisé deux approches complémentaires : (i) soit le C11-BODIPY^{581/591} est directement solubilisé dans un milieu organique apolaire constitué d'octane et de butyronitrile (9 : 1, v : v), (ii) soit cette sonde est incorporée dans des liposomes de dioléoylphosphatidylcholine mis en suspension aqueuse. Dans les deux cas, le Trolox a été utilisé comme molécule

antioxydante de référence et l'information est extraite des données analytiques par l'intermédiaire du calcul de l'aire sous la courbe. Aldini *et al.* (2001) ont par la suite adapté la méthode à la détermination de l'oxydabilité des compartiments aqueux et lipidiques du plasma. Pour suivre l'oxydation dans ce dernier, le 2,2'-azobis(4-méthoxy-2,4-diméthylvaléronitrile) (MeO-AMVN) et le C11-BODIPY^{581/591} ont été utilisés, tandis que pour le compartiment aqueux, l'étendue de l'oxydation a été déterminée en utilisant l'AAPH et la 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine (cf. section précédente).

L'un des avantages de la méthode est que l'oxydation de cette sonde par divers agents oxydants, ainsi que la nature des produits obtenus et les spectres de fluorescence correspondants, sont relativement bien documentés (Drummen *et al.*, 2004). Ainsi, le diène conjugué a été caractérisé comme étant la cible privilégiée de l'oxydation du C11-BODIPY^{581/591}. De plus, cette méthodologie peut être appliquée sur lecteur de microplaques pour une analyse à haut débit, mais également en cytométrie de flux, permettant ainsi d'avoir accès à des sous-populations cellulaires (Ball and Vo, 2002). Concernant les limitations de cette méthode, Huang *et al.* (2002) ont montré que la sonde C11-BODIPY^{581/591} peut perdre 30% de sa fluorescence en absence d'AMVN. Ceci suggère que, de la même manière que l'acide *cis*-parinarique, le C11-BODIPY^{581/591} est photosensible à la longueur d'onde d'excitation. Ce résultat est troublant puisque de nombreuses études ont montré que cette sonde était photostable dans les conditions d'analyse classique de fluorimétrie (Naguib, 1998 ; Beretta *et al.*, 2006).

Notons enfin que d'autres dérivés du BODIPY ont été utilisés. Ainsi Naguib (2000) a testé la faisabilité de la méthode en remplaçant le C11-BODIPY^{581/591} par le BODIPY^{665/676} (Fig. 26). Entre autres avantages, le BODIPY^{665/676} est plus facilement oxydable que le C11-BODIPY^{581/591} en raison de l'extension du système polyénique conjugué ce qui nécessite moins d'AMVN. De plus, son déplacement de Stokes (15 nm) est légèrement plus grand que celui du C11-BODIPY^{581/591} (10 nm), ce qui présente un avantage indéniable pour travailler sur des fluorimètres à filtres.

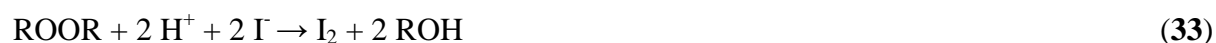
3.2.3. Apparition de produits d'oxydation

À l'opposé de la stratégie de mesure basée sur la disparition du substrat, celle reposant sur l'apparition des produits d'oxydation semble adaptée à l'étude de tous types de systèmes tels que les systèmes modèles, les aliments ou les échantillons biologiques extraits de leur environnement. Ainsi, bien qu'il n'existe pas de marqueurs universels, l'oxydation des

systèmes complexes génère une multitude de produits d'oxydation dont certains sont détectables par des méthodes physico-chimiques, généralement spectrales et/ou chromatographiques. Citons parmi eux, les hydroperoxydes lipidiques, les diènes conjugués, le malondialdéhyde, les composés volatils ainsi que les lipofuscines. Enfin, une autre approche de mesure consiste à mesurer les produits d'oxydation d'une sonde spécifique incorporée artificiellement dans un système vivant, comme c'est le cas des sondes fluorogéniques. Dans ce chapitre, nous nous proposons d'aborder les principales techniques de dosages de ces produits.

3.2.3.1. Mesure des hydroperoxydes

L'une des méthodes classique et normalisée pour quantifier les hydroperoxydes totaux et le peroxyde d'hydrogène correspond au titrage iodométrique (Lea, 1931). Il s'agit de la méthode la plus ancienne et la plus communément utilisée pour suivre l'oxydation d'un substrat lipidique. En milieu acide, les hydroperoxydes (**réaction 32**) et les ROORs (**réaction 33**) réagissent avec l'ion iodure, pour générer de l'iode qui est titré par une solution de thiosulfate de sodium en présence d'empois d'amidon (**réaction 34**).



L'indice de peroxyde (IP) est alors défini comme étant la quantité d'oxygène actif (exprimée en mg) contenue dans 1 g de corps gras et susceptible d'oxyder l'iodure de potassium avec libération d'iode. L'IP atteindra un maximum durant la phase de propagation, puis diminuera lors de la phase de terminaison pour laquelle la cinétique de décomposition des hydroperoxydes est plus importante que celle de leur formation. Il faut souligner que cette méthode présente cependant un certain nombre d'inconvénients. Ainsi, l'IP est une mesure exploitable uniquement pour des échantillons dont l'autoxydation n'a pas atteint un stade trop avancé et dans des conditions de température suffisamment douces pour éviter la décomposition des hydroperoxydes. De plus, l'exposition à la lumière, l'absorption d'iode par les acides gras insaturés et la formation d'iode par oxydation des ions iodures en présence de l'oxygène de l'air interfèrent et peuvent conduire à une sous- ou une surestimation selon les cas (Frankel, 1998). D'autre part, si cette méthode est relativement simple à mettre en œuvre en système anhydre de type « bulk oil », il en est tout autrement des milieux émulsionnés,

alimentaires ou biologiques, pour lesquels l'eau s'avère rédhitoire. Dans ces trois cas, il est alors nécessaire de réaliser préalablement une extraction quantitative, sélective et non altérante des lipides, ce qui suppose un certain nombre de précautions pour éviter tout stress oxydatif. Pour les émulsions, deux stratégies sont envisageables: (i) briser l'émulsion par augmentation de la force ionique ou par centrifugation ou (ii) procéder à une extraction liquide/liquide des lipides suivie d'une élimination du solvant d'extraction par évaporation. En termes d'inconvénients, l'extraction des lipides en présence d'oxygène peut elle-même générer des hydroperoxydes, parfois même en quantité supérieure à celles présentes initialement. Il est de plus préférable d'extraire les lipides à froid par un mélange méthanol/chloroforme, selon la méthode de Folch préconisée pour les lipides des tissus animaux. D'autre part, l'élimination du solvant à haute température entraîne une décomposition significative des peroxydes. La méthode couramment employée consiste à utiliser une évaporation du solvant d'extraction sous pression réduite. Bien que ces difficultés ne soient pas insurmontables, la mesure de l'IP dans les émulsions, les aliments et les échantillons biologiques est grandement freinée par l'aspect discontinu du processus et par les interférences qu'elle implique. Pour toutes ces raisons, des méthodes alternatives ont été développées. Parmi elles, citons les méthodes colorimétriques au thiocyanate (Chapman et Mackay, 1949 ; Mihaljevic *et al.*, 1996) ou au xylénol orange (Jiang *et al.*, 1992 ; Eymard et Genot, 2003), la mesure enzymatique par la glutathion peroxydase (Heath et Tappel, 1976) ou encore la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (van der Voort *et al.*, 1994).

3.2.3.2. Mesure spectrophotométrique des diènes conjugués

En 1931, Gillam *et al.* ont démontré que les graisses naturelles développaient un pic d'absorption proche de 230-235 nm durant le stockage. En fait, plus de 90 % des hydroperoxydes formés par lipoperoxydation présentent un système diénique conjugué résultant d'une stabilisation de l'état radicalaire par réarrangement des doubles liaisons. Ces composés relativement stables absorbent dans le spectre ultraviolet (235 nm) et sont donc quantifiables par spectrophotométrie d'absorption. Toute substance contenant des acides gras polyinsaturés peut servir de substrat oxydable pour cette méthode puisque les diènes conjugués ne peuvent se former qu'à partir d'acides gras comportant au moins deux doubles liaisons, comme l'acide linoléique.

Il serait illusoire de vouloir établir une liste, même partielle, des études réalisées avec cette méthode, aussi nous bornerons nous à quelques exemples. En 1993, Pryor *et al.* ont évalué la

capacité antioxydante de composés synthétiques et naturels, en mesurant leur influence sur la cinétique de formation des diènes conjugués formés par l'oxydation (AAPH) de micelles d'acide linoléique en milieu aqueux. Entre autres avantages, ces auteurs reportent que cette stratégie de mesure est plus sensible que celle basée sur la consommation d'oxygène. [Cournet et Collin \(2003\)](#) ont, quant à eux, étudié l'activité antioxydante de fractions procyanidiques de chocolat en mesurant la cinétique d'apparition des diènes conjugués générés lors de l'oxydation induite par l'AAPH de micelles d'acide linoléique. En outre, l'activité antioxydante de baies, de fruits, de vins et de liqueurs a été comparée par cette méthode en utilisant le linoléate de méthyle comme substrat ([Heinonen et al., 1998](#)). Enfin, la mesure des diènes conjugués est très fréquemment employée pour mesurer l'oxydabilité des LDLs *in vitro*. À titre d'exemple, [Gordoa et al. \(2002\)](#) ont observé que l'apport d' ω -3 diminuait la susceptibilité oxydative des LDLs mesurée par le taux d'apparition et la quantité totale de diènes conjugués, en comparaison de l'apport d' ω -6 ¹².

Bien que la méthode des diènes conjugués puisse être employée pour mesurer la peroxydation lipidique de manière continue, elle souffre néanmoins du fait que le pic d'absorption des diènes conjugués apparaît souvent comme un épaulement d'une large bande générée par les lipides non oxydés ([Defrancesco et al., 1980](#)). Pour pallier ce manque de résolution, plusieurs auteurs ont utilisé la dérivation seconde dans l'évaluation d'huiles végétales, de lipides alimentaires ou d'échantillons biologiques ([Corongiu, 1983 ; 1994 ; Sargent et al., 1993](#)). D'autre part, la mesure directe des diènes conjugués dans les tissus ou les fluides biologiques est bien souvent irréalisable puisque de nombreuses autres substances absorbant dans cette région spectrale sont présentes, comme les protéines hémiques, la chlorophylle, les purines et les pyrimidines. Les composés susceptibles d'interférer doivent donc être identifiés de manière à corriger autant que possible ce biais expérimental. Par ailleurs, l'extraction des lipides au moyen d'un solvant organique avant leur analyse est une approche systématique qui peut permettre de contourner ce problème de parasitage. Enfin, à l'instar de la mesure de l'IP, il importe que cette réaction d'oxydation n'ait pas atteint un stade avancé et que les conditions opératoires soient suffisamment douces afin de limiter la décomposition des hydroperoxydes. Malgré ces inconvénients, il apparaît que la mesure des diènes conjugués reste la méthodologie la plus adaptée et la plus simple pour accéder aux produits d'oxydation lipidique primaire, pour peu que certaines précautions opératoires aient été prises et que les données soient interprétées avec vigilance.

¹² Il est toutefois à noter que l'influence des ω -3 sur l'oxydabilité des LDLs est loin d'être élucidée.

3.2.3.3. Test à l'acide thiobarbiturique (TBA)

En 1944, Kohn et Liversedge (1944) ont observé que les tissus animaux incubés en aérobiose se coloraient en présence d'acide 2-thiobarbiturique (TBA). Par la suite, Bernheim *et al.* (1947) ont associé cette coloration rouge à la formation d'un complexe entre les produits d'oxydation des acides gras insaturés et le TBA. En 1951, Patton *et al.* ont identifié le malondialdéhyde (MDA) comme étant le principal réactant avec le TBA. Plus précisément, ce complexe coloré présentant un maximum d'absorbance à 532 nm résulterait de la condensation de deux moles de TBA et d'une mole de MDA sous l'effet conjoint de la température et de l'acidité du milieu (**Fig. 27**).

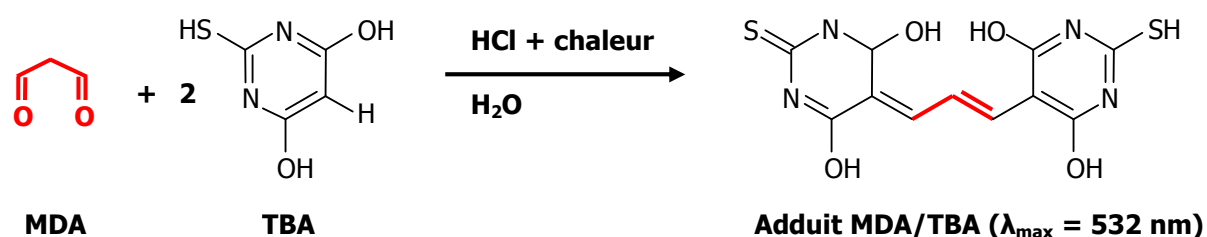


Fig. 27. Formation du chromogène entre le malondialdéhyde (MDA) et l'acide 2-thiobarbiturique (TBA)

La valeur de TBA fut alors définie comme étant la quantité de MDA, exprimée en mg, présente dans 1 kg d'échantillon. De nombreux substrats oxydables ont été utilisés avec cette méthode, notamment des acides gras libres, des huiles végétales, du LDL, mais également des fluides (urine, sérum), des cellules ou des tissus animaux. À titre d'exemple, Poubelle *et al.* (1982), au cours d'une étude réalisée sur du plasma de 66 sujets présumés sains âgés de 19 à 90 ans, ont observé une corrélation positive hautement significative entre la concentration plasmatique de MDA et l'âge des individus.

Ce test a cependant suscité de nombreuses critiques. L'une d'elles est que le TBA n'est pas spécifique du MDA qui, lui-même, n'est pas exclusivement issu de l'oxydation des lipides. En effet, le MDA peut apparaître lors de l'interaction de HO^\bullet avec la vitamine C ou avec le désoxyglucose, tandis que le TBA peut réagir avec d'autres aldéhydes, des produits de la réaction de Maillard, des protéines, des produits de dégradation des sucres, des acides aminés et des acides nucléiques (Janero, 1990 ; Frankel, 1998). Ainsi, à la notion initiale de dosage spécifique du MDA, s'est progressivement substituée la notion plus générale de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS). Entre autres inconvénients, le MDA ne se formerait qu'à partir de chaînes d'acides gras comportant au moins trois doubles liaisons (comme les ω -3) favorisant par conséquent l'attaque du peroxyradical $-\text{C}-\text{OO}^\bullet$ sur la double

liaison portée en $\beta\gamma$, par un mécanisme de cyclisation interne (**Fig. 5**) (Dahle, 1962). Ainsi, le test au TBA ne s'adresse pas aux produits d'oxydation des acides oléique et linoléique, qui ne favorisent pas ce type de cyclisation interne, biaisant de ce fait certains résultats de manière considérable. A titre d'exemple il est surprenant de constater que les TBARs (substances réactives à l'acide thiobarbiturique) sont souvent mesurées pour étudier l'influence d' ω -3 comme les acides eicosapentaénoïque et docosahexaénoïque (dont l'oxydation produit du MDA) sur l'oxydabilité des LDLs, par rapport à un régime riche en acides oléique et linoléique (dont l'oxydation produit peu ou pas de MDA). L'on s'aperçoit ici de l'énorme biais méthodologique puisque l'utilisation de ce test conclura exagérément que les ω -3 augmentent la susceptibilité oxydative des LDLs, ce qui est loin d'être établi (Bonanome *et al.*, 1996 ; Brude *et al.*, 1997 ; Higdon *et al.*, 2001 ; Gordoa *et al.*, 2002). D'autre part, un risque de sous estimation de la réponse peut provenir du fait qu'*in vivo* le MDA est susceptible de former des bases de Schiff linéaires ou cycliques – voire des ponts de réticulation – avec les résidus lysine et arginine des protéines pour former des produits de lipoxydation avancée (ALEs). Notons enfin que le MDA est absent dans beaucoup de lipides oxydés et constitue fréquemment un produit d'oxydation secondaire mineur (Frankel, 1998), ce qui pose un problème de représentativité en sa qualité présumée de marqueur de l'oxydation lipidique. Toutes ces limites ont conduit au développement de techniques alternatives plus spécifiques du MDA et qui reposent, entre autres, sur la purification préalable du complexe TBA/MDA par chromatographie liquide haute performance (Combe, 1996).

3.2.3.4. Mesure des composés volatils par chromatographie

Parmi les différents composés volatils issus de l'oxydation lipidique secondaire (ou de la dégradation des hydroperoxydes lipidiques), certains sont spécifiques de l'oxydation d'une famille particulière d'acides gras polyinsaturés. Le propanal est le principal marqueur de l'oxydation des acides gras de la famille ω -3 tandis que l'hexanal et le pentanal signent l'existence d'une voie d'oxydation des acides gras de la série ω -6. L'hexanal est le produit terminal de l'oxydation lipidique le plus fréquemment mesuré, puisque sa formation est beaucoup plus importante que celle de la plupart des autres produits d'oxydation secondaire. Cependant, mesurer l'étendue de l'oxydation avec seulement un ou deux marqueur(s) relève d'une approche cyclopéenne. La prise en compte d'un large ensemble de composés devrait

être une approche à privilégier, d'autant que les progrès récents et la généralisation des couplages CPG-SM facilitent grandement la tâche.

Pour collecter les composés volatils marqueurs de l'oxydation, différentes approches sont possibles, parmi lesquelles les méthodes (i) d'extraction ou (ii) d'analyse d'espace de tête.

(i) Concernant les méthodes d'extraction citons l'extraction/distillation simultanée (EDS), au cours de laquelle l'échantillon est distillé durant plusieurs heures. Le couplage EDS-CPG a été utilisé pour quantifier l'hexanal produit durant le stockage de produits carnés (Vara-Ubol et Bowers, 2001). L'EDS présente l'avantage d'extraire les composés d'intérêt en quantités importantes puisque les volatils ont généralement une solubilité élevée dans les solvants organiques. Cette méthode est cependant longue et laborieuse et nécessite une étape d'évaporation du solvant qui peut conduire à une dégradation substantielle des composés fragiles.

(ii) L'analyse d'espace de tête, quant à elle, peut être réalisée par les techniques d'espace de tête statique (SHS), dynamique (DHS) ou de micro-extraction en phase solide (SPME).

Concernant la SHS, l'échantillon est disposé dans un flacon hermétiquement fermé. La plupart des composés volatils à la température d'analyse quitte l'échantillon et passe dans l'espace de tête gazeux qui le surplombe. Lorsque l'équilibre est atteint, une aliquote de l'espace de tête est collectée puis injectée en CPG. Selon Frankel *et al.* (1989), cette méthode couplée à la CPG est rapide (15 déterminations/h), spécifique de l'hexanal et peut être employée pour mesurer la lipoperoxydation dans des échantillons biologiques de type foie de rat. La SHS a également été employée pour mesurer l'effet antioxydant du butylhydroxytoluène sur l'oxydation de produits carnés (Wu *et al.*, 1998). Les principaux avantages de cette méthode sont, d'une part, de ne pas nécessiter de solvant d'extraction et, d'autre part, d'être peu coûteuse, facile d'utilisation et automatisable. Cependant, la SHS ne permet de quantifier qu'une fraction des composés d'intérêt. En effet, puisque l'équilibre s'établit entre les volatils présents dans l'espace de tête et ceux restant dans l'échantillon, les quantités de composés récupérés demeurent faibles, ce qui limite la technique en terme de sensibilité. L'élévation de la température d'extraction pourrait certes accroître les quantités recueillies, mais la température doit être maintenue le plus bas possible afin de minimiser la génération de nouveaux produits d'oxydation et/ou la dégradation thermique des marqueurs de l'oxydation.

A l'opposé de la SHS qui est fondée sur l'établissement d'un équilibre de partage des volatils entre l'échantillon et l'espace de tête, l'espace de tête dynamique (DHS) empêche l'établissement de cet état d'équilibre. Ainsi, en DHS, l'échantillon est continuellement purgé

par un gaz inerte qui extrait les composés volatils. L'effluent gazeux passe ensuite au travers d'un piège constitué d'un polymère poreux, lequel retient les analytes volatils. Parmi les pièges disponibles, le Tenax[®], capable d'adsorber un grand nombre de molécules, reste le plus employé. Puisque les volatils sont constamment évacués puis piégés, leur quantité injectée en CPG est importante. Plusieurs études ont démontré l'efficacité du couplage DHS-CPG pour évaluer le statut oxydatif de différentes viandes (Shahidi *et al.*, 1987 ; St. Angelo *et al.*, 1990 ; Lai *et al.*, 1995). Malgré sa sensibilité, la méthode DHS souffre du fait que le profil de concentration des composés volatils peut varier en fonction de la disponibilité de l'oxygène dans le flacon. D'autre part, l'instrumentation est complexe, multipliant par voie de conséquence les sources d'erreurs. De surcroît, la DHS requiert environ 15 min de plus par échantillon que la SHS (Warshall et Wampler, 1990).

La SPME est une méthode d'extraction gaz-solide sans solvant, utilisant les propriétés adsorbantes d'une garniture polymérique déposée à l'intérieur d'une fibre que l'on met en contact avec l'espace de tête. Cette méthode comporte trois étapes (**Fig. 28**) : (i) la phase d'équilibre dans laquelle les composés volatils migrent de l'échantillon à l'espace de tête jusqu'à atteindre l'équilibre, (ii) la phase d'adsorption, qui consiste en un équilibre de partage des composés volatils entre la fibre et l'espace de tête et (iii) la phase de désorption thermique, au cours de laquelle la fibre est introduite dans un injecteur CPG. Les analytes sont alors rapidement désorbés pour pénétrer dans la colonne.

De nombreuses études ont utilisé la SPME-CPG pour évaluer l'oxydation lipidique en présence ou en absence d'antioxydants dans des produits carnés (Brunton *et al.*, 2000 ; Doleschall *et al.*, 2002 ; Goodridge *et al.*, 2003 ; Beltran *et al.*, 2004) ou dans des émulsions d'huiles végétales (Almajano et Gordon, 2004).

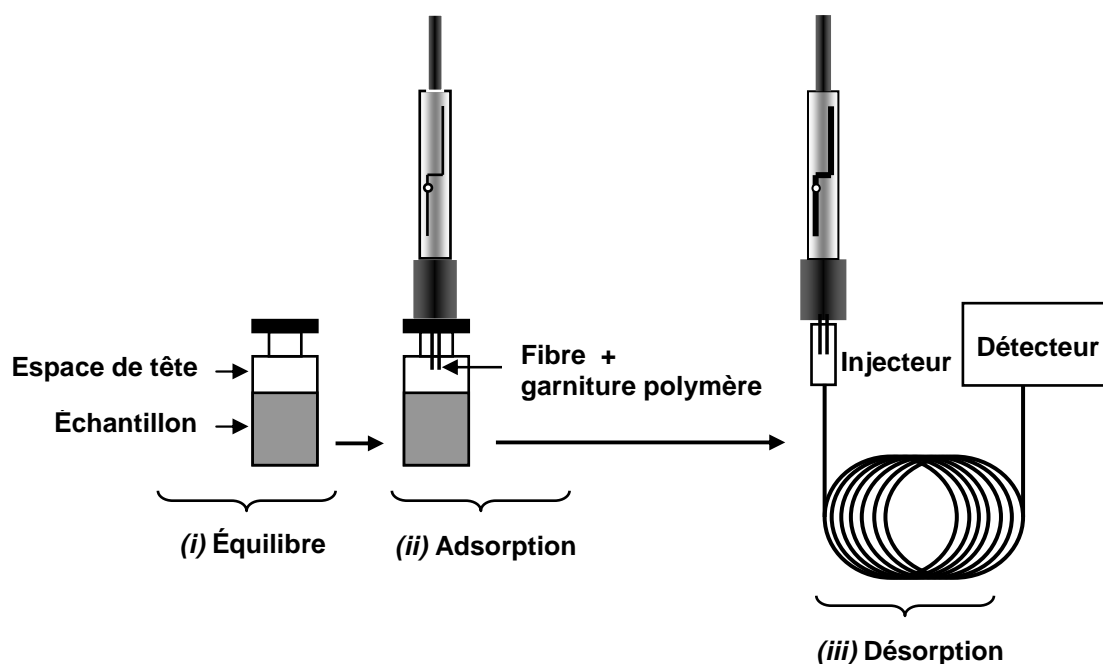


Fig. 28. Procédé de micro-extraction en phase solide.

La SPME est résolument une méthode d'avenir, offrant à l'analyste une grande facilité d'utilisation, d'autant plus qu'il est possible d'automatiser l'extraction. En revanche, l'inconvénient majeur est lié à la détérioration rapide de la fibre, ce qui nécessite des études de répétabilité à long terme. Notons que ces fibres sont rarement utilisables au-delà de 50 extractions et qu'elles peuvent générer des pollutions par des alkylcyclodioxanes (détectables en spectrométrie de masse par les ions de 73, 77 et 147 m/z) (Laguerre *et al.*, 2007).

En conclusion, chaque méthode d'extraction possède ses propres limites, bien que la SPME gagne en popularité en raison de sa facilité d'utilisation.

3.2.3.5. Mesure des lipofuscines

La peroxydation lipidique est connue pour générer des aldéhydes hautement réactifs tels que le 4-hydroxy-2-nonenal et le MDA, qui peuvent par la suite réagir avec des amines primaires pour former des produits fluorescents. Un tel processus biochimique est probablement impliqué dans la formation de la lipofuscine et des pigments céroïdes durant le vieillissement (Tirmenstein *et al.*, 1998). Comme nous l'avons préalablement exposé, les mécanismes chimiques à l'œuvre dans la formation de ces produits fluorescents sont complexes et l'identité des produits reste à établir. Du fait de la similarité entre les propriétés spectrales des bases de Schiff conjuguées comme le 1-amino-3-iminopropène (λ_{ex} : 370-400/ λ_{em} : 450-470 nm) et celles des lipofuscines (λ_{ex} : 340-390/ λ_{em} : 430-490 nm), Chio et Tappel (1969 a, b) ont

suggéré que les fluorophores caractéristiques du vieillissement étaient principalement composés d'amino-3-iminopropène formé par réaction entre le MDA et les amines primaires des protéines et des phospholipides. Cependant, comme le reportent Yamada *et al.* (2001), les efforts expérimentaux ultérieurs pour détecter ces composés n'ont pas permis de valider cette hypothèse. De manière alternative, Kikugawa *et al.* (1984 b) proposèrent, pour leur part, que le MDA pouvait réagir avec des amines pour produire de la dihydropyridine. En parallèle de ces hypothèses, il a été montré que certains époxyalcénals (Hidalgo et Zamora, 1993) ainsi que le 4-hydroxy-2-nonénal (Itakura *et al.*, 1998) pouvaient réagir avec des amines pour former des dérivés pyrroles fluorescents.

Toutefois, si la nature chimique de ces pigments reste encore à définir, les plages spectrales d'excitation et d'émission sont quant à elles parfaitement établies. Ainsi, de nombreux auteurs sont parvenus à utiliser la formation de produits fluorescents comme indicateur de la peroxydation lipidique d'échantillons biologiques (Dillard et Tappel, 1973 ; Bose et Chatterjee, 1993 ; Shimasaki *et al.*, 1988 ; Shimasaki, 1994 ; Beppu *et al.*, 1987 ; Ohyashiki *et al.*, 1991). Cependant, comme le soulignent Tirmenstein *et al.* (1998), ces tests ne sont pas réalisés *in situ* et nécessitent de ce fait un échantillonnage considérable, ce qui peut s'avérer laborieux. En effet, les échantillons sont soit extraits avec des solvants organiques soit dissouts dans du dodécyl sulfate de sodium avant d'être analysés en fluorimétrie. À notre connaissance, on doit à Tirmenstein *et al.* (1998) d'avoir adapté ce principe de mesure à la lecture en microplaque de 96 puits.

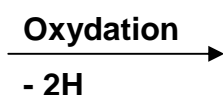
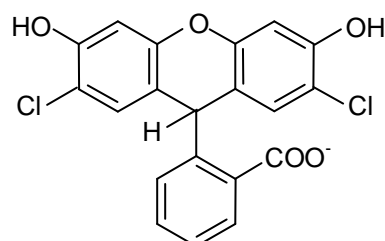
3.2.3.6. Mesure des produits d'oxydation de sondes cellulaires fluorogéniques

Une molécule fluorogénique est un dérivé de fluorophore. Par le biais de modifications oxydatives, la molécule fluorogénique recouvre les propriétés fluorescentes du fluorophore dont elle dérive. Ces sondes exogènes sont par conséquent extensivement utilisées pour détecter un stress oxydant au niveau cellulaire. Dans cette partie, quatre molécules fluorogéniques seront brièvement présentées : (i) la 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine et la (ii) dihydrorhdamine 123, à spécificité cytosolique, (iii) la dihydrofluorescéine, à spécificité mitochondriale, et enfin (iv) le dihydroéthidium, à spécificité nucléaire.

(i) Les esters éthyliques de 2',7'-dihydrochlorofluorescéine sont perméables et diffusent plus facilement à l'intérieur des cellules que la molécule non estérifiée (Nègre-Salvayre *et al.*, 2002). Une fois internalisée, la fonction ester est hydrolysée par des estérases intracellulaires

(Sanchez Ferrer *et al.*, 1990) pour générer la 2,7-dihydrodichlorofluorescéine, qui va former un composé fluorescent, la 2,7-dichlorofluorescéine (**Fig. 29**) après oxydation par les EROs ou ERNs intracellulaires.

2',7'-Dichlorodihydrofluorescéine



2',7'-Dichlorofluorescéine
(λ_{ex} : 500/ λ_{em} : 525 nm)

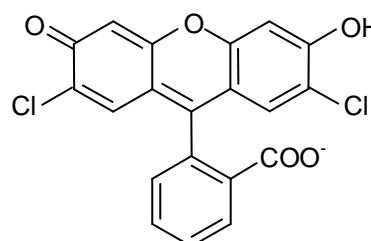


Fig. 29. Oxydation de la 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine en 2',7'-dichlorofluorescéine.

La fluorescence résultante (λ_{ex} : 500/ λ_{em} : 525 nm) peut être observée par microscopie à fluorescence (Greene *et al.*, 2000 ; Görlach *et al.*, 2000), ou mesurée par spectrofluorimétrie (Royall et Ischiropoulos, 1993 ; Hyslop et Sklar, 1984 ; Carter *et al.*, 1994) ou par cytométrie de flux (Hempel *et al.*, 1999 ; Vowells *et al.*, 1995). Le choix de la technique dépend généralement du type cellulaire. En effet, la cytométrie de flux est largement utilisée pour les cellules en suspension, tandis que la microscopie ou la spectrofluorimétrie sont plus indiquées pour les cellules adhérentes. Concernant l'oxydation, elle peut être soit naturelle, auquel cas les durées d'analyses seront très longues en fonction du métabolisme cellulaire, soit artificiellement accélérée par l'addition d' H_2O_2 , d'antimycine (inhibition du complexe III) ou encore de LDLs préalablement oxydés (Nègre-Salvayre *et al.*, 2002). Notons également que la méthode spectrofluorimétrique est adaptée à la mesure à haut débit en lecteur de microplaques. En termes d'inconvénients, Nègre-Salvayre *et al.* (2002) ont reporté la fuite possible de la 2',7'-dihydrochlorofluorescéine hors de la cellule viable. Par ailleurs, certains auteurs ont montré que cette sonde n'était pas spécifique d'une espèce oxydante particulière. Ainsi, d'après Ischiropoulos *et al.* (1999), les espèces $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , ONOO^- et HOCl sont toutes susceptibles d'oxyder la 2,7-dihydrochlorofluorescéine. Possel *et al.* (1997) ont observé, quant à eux, en milieu acellulaire et sur primo-culture de microglie, une sensibilité à l'oxydation par le peroxynitrite plus élevée que celle obtenue avec H_2O_2 , NO^{\bullet} , et $\text{O}_2^{\bullet-}$. Par la suite, Glebska et Koppenol (2003) et récemment Wardman (2007) ont réfuté cette spécificité allant même jusqu'à rejeter l'existence d'une interaction directe entre le peroxynitrite et la 2',7'-dihydrochlorofluorescéine. Selon ces auteurs, l'apparition de fluorescence induite par le

peroxynitrite impliquerait plutôt une médiation par ses produits de dégradation de nature radicalaire comme HO^\bullet , NO_2^\bullet et $\text{CO}_3^{\bullet-}$ (radical carbonate).

(ii) La dihydrorhodamine 123 est un dérivé non fluorescent de la rhodamine 123 utilisé comme sonde fluorogénique spécifique des espèces oxydantes cytosoliques (Diaz *et al.*, 2003). Une fois internalisée dans le cytoplasme, la dihydrorhodamine 123 est oxydée par les EROs en rhodamine 123 (λ_{ex} : 500/ λ_{em} : 536 nm) qui, grâce à sa charge positive ($\text{C}=\text{N}^+\text{H}_2$), pénètre à l'intérieur de l'environnement mitochondrial négatif (-180 mV) dans lequel la sonde est par la suite séquestrée (Fig. 30).

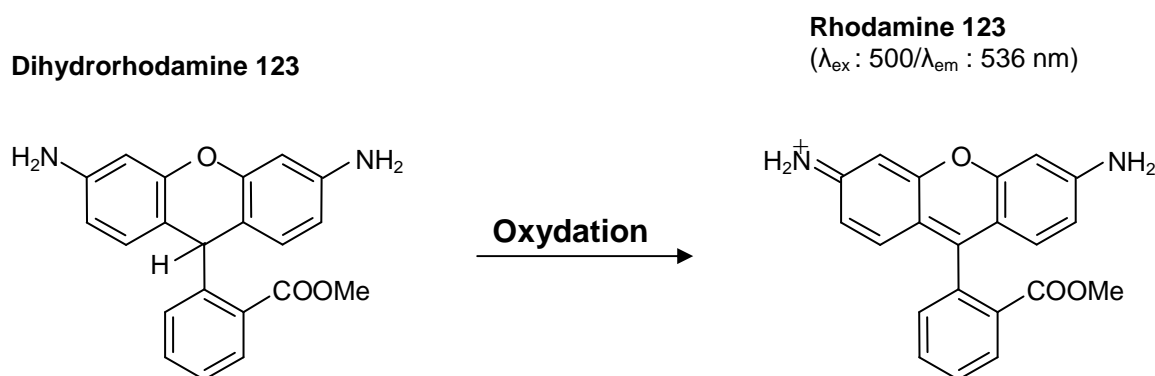


Fig. 30. Oxydation de la dihydrorhodamine 123 en rhodamine 123.

Par conséquent, la dihydrorhodamine 123 est une sonde qui détecte les espèces oxydantes cytosoliques et non pas mitochondriales. Par ailleurs, le fait que l'oxydation (dans le cytosol) et la détection (dans la mitochondrie) de ces sondes aient lieu dans des compartiments différents représente une limite à son utilisation pour localiser les espèces oxydantes par microscopie à fluorescence. Enfin, à l'instar de la 2,7'-dihydrochlorofluorescéine, la spécificité de la dihydrorhodamine 123 reste à établir. Selon Emaus *et al.* (1986), la dihydrorhodamine 123 ne détecterait pas l' $\text{O}_2^{\bullet-}$, mais plutôt le peroxyde d'hydrogène produit par la cellule.

(iii) La dihydrofluorescéine est un dérivé non fluorescent de la fluorescéine (λ_{ex} : 490/ λ_{em} : 515 nm) utilisé comme sonde fluorogénique spécifique des espèces oxydantes mitochondriales (Thomas, 1986 ; Hockberger *et al.*, 1999). Diaz *et al.* (2003) ont par la suite confirmé cette spécificité mitochondriale en montrant par microscopie à fluorescence que la dihydrofluorescéine était majoritairement oxydée par les espèces réactives strictement localisées dans la matrice mitochondriale. L'utilisation de cette sonde en complément d'une sonde à spécificité cytosolique, structurellement proche de la 2,7'-dihydrochlorofluorescéine,

a également montré que la vitamine E piégeait préférentiellement les espèces oxydantes cytosoliques plutôt que mitochondriales (Diaz *et al.*, 2003). Ce résultat suggère donc que la vitamine E n'est pas capable de diffuser à travers la double membrane mitochondriale, ce qui est peut être à rapprocher de leur constitution particulièrement riche en cardiolipine, mais également de l'environnement mitochondrial négatif (-180 mV).

(iv) Le dihydroéthidium est un dérivé non fluorescent de l'éthidium, ce dernier exerçant une fluorescence bleue dans le cytoplasme (λ_{ex} : 518/ λ_{em} : 605 nm). Une fois oxydée en éthidium par les EROs, la sonde présente la particularité de se lier à l'ADN, ce qui a pour conséquence de colorer le compartiment nucléaire d'une fluorescence rouge. Nègre-Salvayre *et al.* (2002) reportent que cette fluorescence rouge est induite par au moins deux paramètres : (i) le processus d'oxydation qui permet de convertir le dihydroéthidium en éthidium et (ii) l'intercalation subséquente de l'éthidium au sein de l'ADN nucléaire, ce qui exacerbe la fluorescence. Cette exacerbation de la fluorescence par le mécanisme d'intercalation nucléaire augmente grandement la sensibilité de la méthode et suggère qui plus est, que la fluorescence apparente n'est pas uniquement le reflet de l'oxydation du dihydroéthidium. Ce risque d'artefact peut cependant être significativement diminué en utilisant de faibles concentrations de dihydroéthidium.

CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. PRODUITS CHIMIQUES

L'huile de tung (masse moléculaire moyenne : 872g/mol) extraite de graines d'*Aleurites fordii* a été achetée chez Aldrich (Réf. 44037). La solution de tampon phosphate (pH 7,2 ; absence de bactéricide), le bis-benzimide (réactif de Hoechst 33258), l'ADN de sperme de saumon, l'EDTA (0,5 M), le Triton X-100, le polyoxyéthylène(23)lauryl'éther (Brij 35, masse moléculaire estimée : 1198 g/mol), le catalyseur Amberlite IR 120 H, la lipase de *Candida antarctica* B, le butanol, l'octanol, le dodécanol, l'hexadécanol, le tampon Tris-HCl 1 M (pH 8), la phénolphtaléine, le tamis moléculaire, l'épicatéchine, la catéchine, la quercétine, les acides 5-caféoylquinique, rosmarinique, gallique, caféique et férulique, le sel disodique de fluorescéine, la 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine-diacétate, le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ont été achetés chez Sigma (Saint Quentin, France). L' α -, le β -, le γ - et le δ -tocophérol ont été achetés chez VWR (VWR International SAS, Fontenay sous Bois, France). L'oleuropéine et la lutéoline-7-O-glucoside (99 % de pureté) ont été obtenues chez Extrasynthèse (Genay, France). Tous les solvants utilisés sont de qualité HPLC ou analytique et proviennent de Sigma (Saint Quentin, France). Le Trolox a été acheté chez Acros Organic (Geel, Belgique) et le 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochlorhydrique (AAPH) chez Wako Chemical (Neuss, Allemagne). Le Dubelco's modified Eagle's medium (DMEM), le sérum de veau fœtal complet, la solution de tampon phosphate stérile, la gentamicine et l'amphotéricine B ont été achetés chez Invitrogen (Cergy Pontoise, France).

2. MESURE DE LA CAPACITÉ ANTIOXYDANTE DE COMPOSÉS Purs OU D'EXTRAITS VÉGÉTAUX

2.1. PRÉPARATION DES EXTRAITS DE FEUILLES D'OLIVIER

Les feuilles jeunes et âgées (~ 1 et 3 ans, respectivement) ont été collectées sur des oliviers (*Olea europea*) de variété Picholine durant une journée au Domaine de l'Olivie (Combaillaud, France) en juin 2007. Après collecte, les deux types de feuilles ont été congelés dans l'azote liquide et lyophilisés sous vide (10^{-3} Atm) durant 24 h dans un cryodessiccateur (Alpha 1-4, Fischer Bioblock Scientific, Marseille, France). Les feuilles lyophilisées sont ensuite broyées puis tamisées à 1 mm. Afin d'éliminer les lipides neutres, ~ 3,5 g de poudre préalablement obtenue, sont soumis à une extraction solide-liquide à l'hexane réalisée au moyen d'un extracteur automatique de modèle ASE 200 (accelerated solvent extraction, Dionex SA, Voisins Le Bretonneux, France) combinant l'action de la pression et de la température. La fraction insoluble est ensuite soumise à des extractions en cascade au dichlorométhane, à l'acétate d'éthyle puis au méthanol (**Fig. 31**) dans le même appareillage.

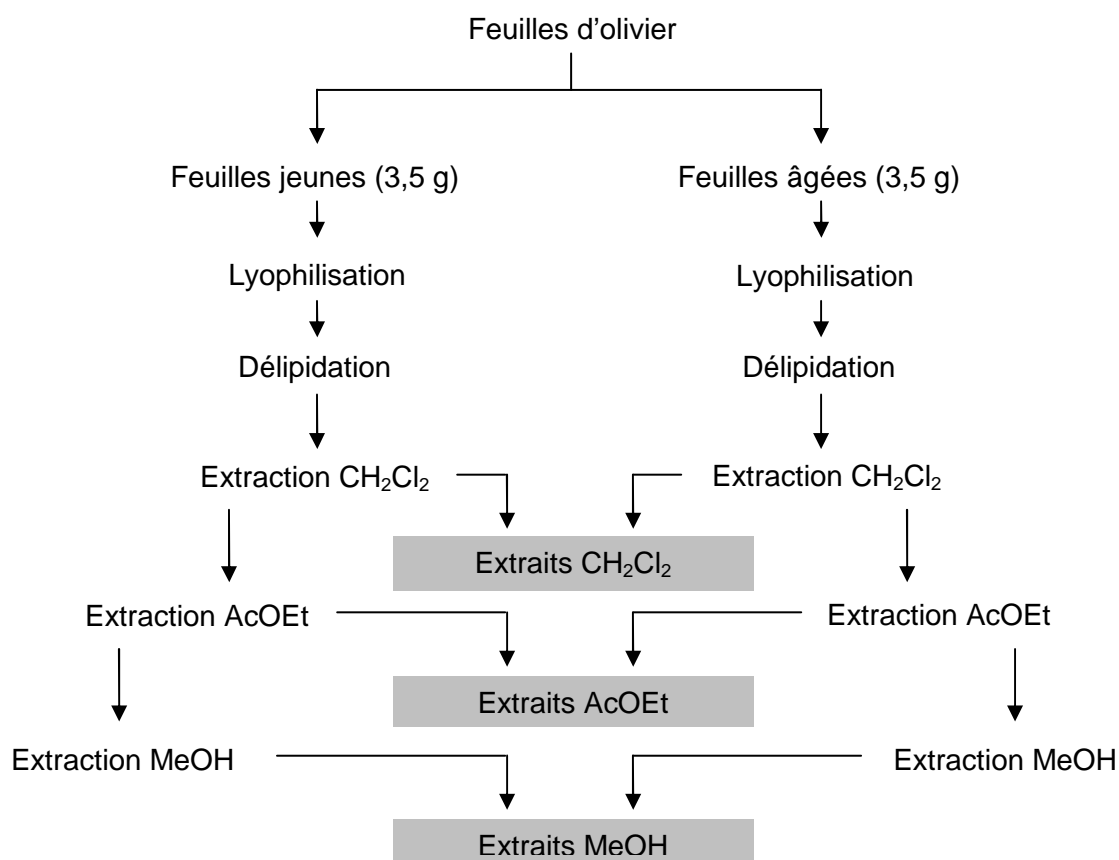


Fig. 31. Schéma des extractions en cascade des feuilles d'olivier. Les volumes des solvants d'extraction utilisés sont de 250 mL. CH₂Cl₂ : dichlorométhane ; AcOEt : acétate d'éthyle ; MeOH : méthanol.

Par la suite, chaque phase organique est éliminée par évaporation sous vide au moyen d'un évaporateur rotatif puis passage sous un flux constant d'azote. Les extraits obtenus (dont les masses varient de 120 à 1033 mg selon le solvant) sont alors stockés à 4°C dans des flacons ambrés (filtre UV) jusqu'à leur utilisation.

2.2. CARACTÉRISATION DES EXTRAITS DE FEUILLES D'OLIVIER PAR HPLC/MS-ESI

Les extraits de feuilles d'olivier sont préalablement dissous dans du méthanol à 4 mg/mL. Puis, 20 µL de ces solutions sont injectés dans un appareillage HPLC couplé à un spectromètre de masse. L'équipement employé est constitué d'une chaîne HPLC (Thermo Fisher, San José CA, USA) couplée à un spectromètre de masse (Thermo Fisher Serie LCQ, San José CA, USA). La chaîne HPLC est équipée d'une boucle, d'un passeur automatique et d'un détecteur à barrette de diode (photodiode detector array, PDA) qui permet d'enregistrer le signal à des longueurs d'onde fixes (327, 280 et 254 nm), mais également en mode balayage entre 200 et 700 nm. La séparation des composés est réalisée sur une colonne ACE C18 (5 µm, 250 × 4,6 mm, Houilles, France) en utilisant comme solvant A un mélange eau/acide formique (99,9 : 0,1 ; v/v) et comme solvant B un mélange acétonitrile/eau/acide formique (80 : 19,9 : 0,1 ; v/v/v). Le débit d'injection est de 0,3 mL/min. Le gradient d'élution utilisé pour la séparation chromatographique de composés phénoliques d'extraits de feuilles d'olivier est le suivant : 0 min, 97 % de A ; 50 min, 65 % de A ; 5 min, 50 % de A ; 5 min, 20 % de A ; 10 min, 0 % de A ; 10 min, 97 % de A.

L'analyseur de masse utilisé est équipé d'une trappe d'ions quadripôle et d'une source d'ionisation externe opérant à pression atmosphérique munie d'un système d'injection intégré (Thermo Finnigan Serie LCQ, San José CA, USA). L'acquisition des données est effectuée en mode balayage (mode SM), mais également en fragmentant l'ion parent (mode SM²). Les conditions d'analyse sont paramétrées comme suit : courant d'ionisation : 4,54 kV ; température du capillaire : 250°C ; débit d'azote : 20 (unités arbitraires) ; énergie de collision employée pour l'acquisition en mode SM² : 30-35 %.

2.3. CARACTÉRISATION DE L'HUILE DE TUNG

2.3.1. Préparation des esters méthyliques d'huile de tung

La détermination en acides gras de l'huile de tung est obtenue par transformation de l'ensemble des acides gras en esters méthyliques. La dérivation consiste en une méthanolyse basique suivie d'une estérification acide selon la norme AFNOR NF T60-203.

Pour cela, une solution de méthylate de sodium est préparée en mélangeant 62 mL d'une solution méthanolique de méthylate de sodium (0,5 M), 560 mL de méthanol et une goutte de phénolphthaléine pure. Une solution de méthanol chlorhydrique est, quant à elle, préparée en mélangeant 50 mL de chlorure d'acétyle avec 625 mL de méthanol. À l'aide d'une pipette Pasteur, l'huile de tung (20 à 30 mg) est introduite dans un ballon de 50 mL et 3 mL de la solution de méthylate de sodium sont alors ajoutés. Une canne de saponification est placée au-dessus du ballon et le mélange est chauffé à reflux (65°C) en présence de pierre ponce durant 10 min. Par la suite, 3 mL de la solution de méthanol chlorhydrique sont ajoutés par le haut de la canne de saponification jusqu'à décoloration de la phénolphthaléine. Le mélange est de nouveau chauffé à reflux durant 10 min à la même température. Après refroidissement du milieu réactionnel à température ambiante, 10 mL d'eau distillée et 6 mL d'hexane sont ajoutés dans le ballon. Après agitation manuelle, le milieu est laissé au repos 5 min et quelques mL de la phase supérieure contenant les esters méthyliques sont prélevés. Cette phase organique est séchée par ajout de Na₂SO₄ anhydre, puis filtrée (millipore 0,45 µm) pour être analysée en chromatographie en phase gazeuse (CPG). La CPG utilisée (Agilent série 6890, Sigma-Aldrich) est équipée d'une colonne capillaire Supelcowax 10 (SGE, Courtaboeuf, France) de 30 m de longueur, 0,32 mm de diamètre interne et 0,25 µm d'épaisseur de film, d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'un intégrateur enregistreur Merck D 2000. L'analyse chromatographique est effectuée comme suit : 1 µL de l'échantillon en solution hexanique est injecté en mode division (rapport de fuite 1/100). Les températures de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 250 et 270°C. Le débit du gaz vecteur (Hélium) est de 2 mL/min. Enfin, le gradient de température du four est réalisé comme suit : palier de 2 min à 185°C, montée en température (4°C/min) de 185 à 225°C, palier final de 3 min à 225°C.

2.3.2. Caractérisation des triacylglycérols de l'huile de tung par HPLC

Le profil triglycéridique de l'huile de tung est déterminé par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC). La chaîne HPLC (Thermo Fisher, France) comporte une

pompe (modèle Spectra System P1000xR), un passeur d'échantillon automatique (modèle Spectra System AS 1000) et un détecteur à diffusion de lumière (DDL, modèle ALLTECH, 500 ELSD). Deux colonnes octadécyl C18 de type QS LICHROSPHER 5 ODS 2 (5 μ m, 250 x 4,6 mm ; Interchim) maintenues à 30°C sont ensuite utilisées pour la séparation. Le débit dans les colonnes est de 1 mL/min, la pression de l'ordre de 1300 psi et la boucle d'injection d'une capacité de 100 μ L ; le solvant d'élution est, quant à lui, composé d'un mélange acétonitrile/acétone (50 : 50, v/v, solvant A) et de chloroforme (solvant B). L'élution est mise en œuvre avec un gradient linéaire comme suit : 0 min, 100 % de A ; 60 min, 80 % de A (palier 80 min) ; 95 min, 100 % de A (palier 110 min). La détection au DDL est effectuée à 30°C sous une pression de 44,2 psi.

2.3.3. Caractérisation de la réiodistribution de l'huile de tung

L'étude de la réiodistribution de l'huile de tung est réalisée conformément à la norme AFNOR T60-241. 100 mg d'huile de tung sont introduits dans un tube à hémolyse et mélangés avec 2 mL d'une solution tampon (Tris-HCL 1 M, pH 8), 0,5 mL d'une solution de cholate de sodium (1 g/L), et 0,2 mL d'une solution de chlorure de calcium (220 g/L). L'ajout de 20 mg de lipase pancréatique de porc (hydrolysant les triacylglycérols en positions *sn-1* et *sn-3*) est immédiatement suivi d'une agitation manuelle du milieu réactionnel durant 3 min dans un bain-marie chauffé à 40°C. La réaction est ensuite stoppée par ajout de 1 mL d'une solution d'acide chlorhydrique (6 M). La phase lipidique est extraite par 1 mL d'éther diéthylique. Après centrifugation (3000 g, 10 min, 20°C, centrifugeuse Sigma, Fischer Bioblock Scientific, Marseille, France), la phase organique est prélevée puis déposée automatiquement (300 μ L) sur un plaque de silice préparative (Merck, 10 cm x 20 cm x 0,25 mm). La phase mobile utilisée lors de la migration est constituée d'hexane/éther diéthylique/acide acétique (50 : 50 : 1, v/v/v). Les monoacylglycérols (MAGs) présentant un rapport frontal de 0,15 sont grattés puis transformés en esters méthyliques directement à partir de la silice grattée afin d'être injectés en chromatographie en phase gazeuse (cf. section 2.3.1.).

Cette méthode permet de déterminer la composition en AGs de la position interne des TAGs. La composition en AG totaux des TAGs étant connue, les pourcentages des AGs correspondant à la moyenne des 2 positions externes peuvent être calculés à partir de l'équation 1 comme suit :

$$A_e = \frac{3A_t - A_i}{2} \quad (\text{Eq 1})$$

avec A_e , A_i et A_t , correspondant respectivement aux % molaires des AGs en position externe, interne et totale.

2.3.4. Analyses des tocophérols endogènes de l'huile de tung

La quantification des tocophérols endogènes de l'huile de tung est effectuée selon la norme AFNOR 9936, par la technique d'HPLC en phase normale couplée à une détection fluorimétrique (λ_{ex} : 290 nm/ λ_{em} : 330 nm). L'appareillage HPLC se compose d'une pompe (modèle Spectra System P1000xR), d'un injecteur automatique (modèle Spectra System AS1000) et d'un détecteur à fluorescence (modèle Spectra System FL3000). La colonne de silice employée est de type Hypersil Silica (Si 60 ; 5 μm ; 250 x 4,6 mm) et maintenue à 30°C. La phase éluante est composée d'un mélange d'hexane et de dioxane de qualité HPLC (97 : 3 ; v/v). Le débit de la colonne est de 1 mL/min, avec une pression de 350 psi. La quantification et l'identification des tocophérols sont réalisées à partir de composés standards d' α -, β -, γ - et δ -tocophérols (VWR International SAS, Fontenay sous Bois, France).

2.3.5. Préparation de l'huile de tung purifiée

Les composés polaires de l'huile de tung (comprenant le β -tocophérol) sont retirés en passant 25 mL d'une solution hexanique d'huile de tung (200mg/mL), suivi de 25 mL d'hexane pur à travers une colonne d'alumine préparée comme suit : 25 g d'alumine dans l'hexane sont introduits dans une colonne en verre et l'excès d'hexane est éliminé jusqu'à affleurement. Après retrait complet des tocophérols, l'hexane est évaporé sous vide (-2,9 psi) à 35°C dans un évaporateur rotatif équipé d'une pompe à vide (Laborport, KNF euburger GmbH, Freiburg, Allemagne). Il faut préciser que toutes les manipulations doivent être réalisées autant que possible à l'abri de la lumière. Enfin, l'huile de tung purifiée est aliquotée dans des tubes en verre ambré, puis inertée sous flux d'azote et stockée à -18°C jusqu'à son emploi. L'utilisation d'aliquotes jetables d'huile de tung (i.e., 15 aliquotes pour 15 microplaques) permet d'éviter les retraits successifs d'un même échantillon et minimise de ce fait l'apparition d'éventuelles oxydations.

2.4. PROTOCOLE DU TEST DES TRIÈNES CONJUGUÉS

(i) la capacité antioxydante de composés phénoliques purs ou d'extraits de feuilles d'olivier est mesurée en appliquant la procédure CAT (conjugated autoxidizable triene). Les solutions antioxydantes sont préparées comme suit : une solution méthanolique de composés phénoliques purs, d'extraits de feuilles d'olivier ou de Trolox (antioxydant de référence) est préparée à la concentration désirée. Différents volumes de ces solutions méthanoliques (25, 50, 75 et 100 μL) sont, par la suite, ajoutés à 24,9 mL de solution de tampon phosphate, pH 7,2, puis complétés avec du méthanol (respectivement 75, 50, 25 et 0 μL) (**Fig. 32**). Toutes les solutions de tampon d'antioxydants ou de Trolox sont préparées extemporanément.

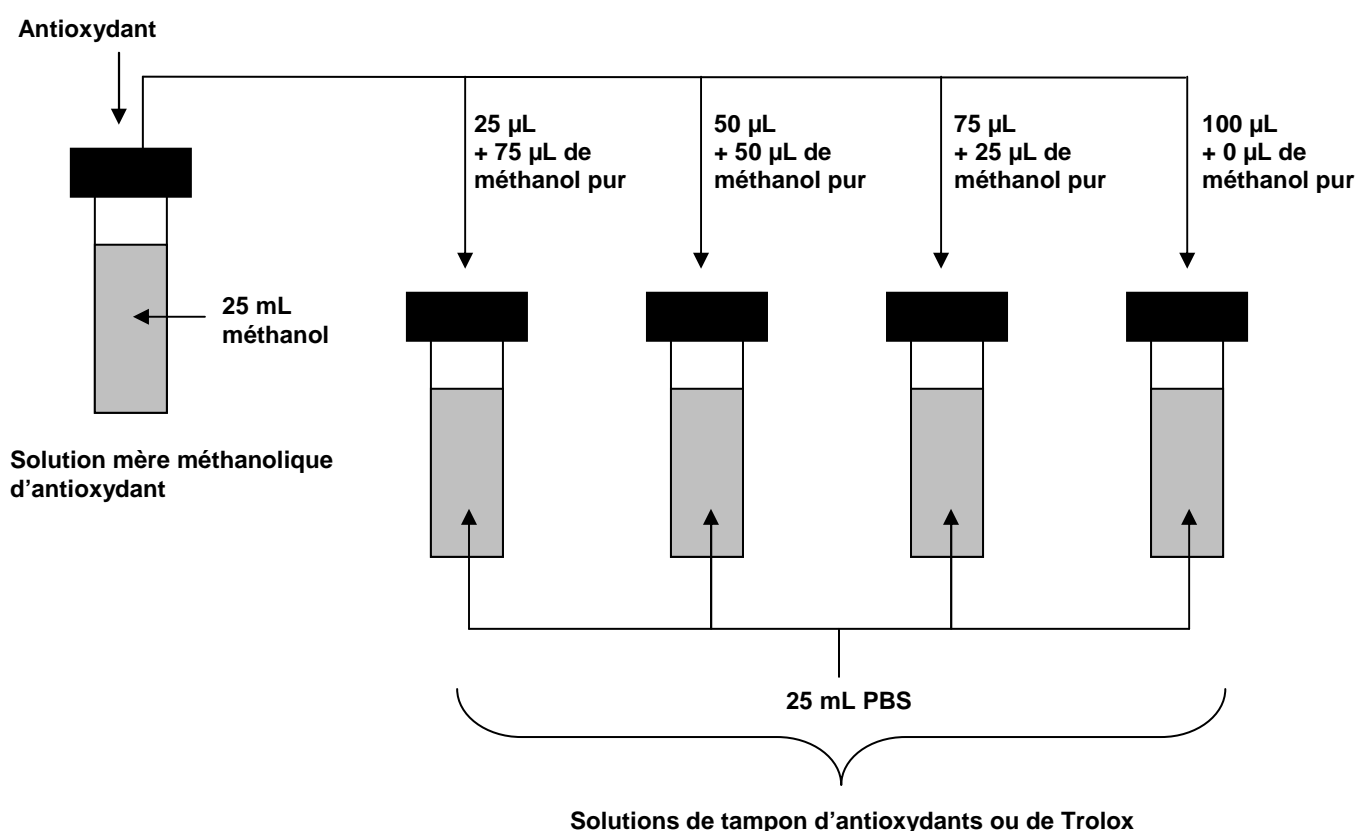


Fig. 32. Schéma de préparation des solutions d'antioxydants dans le tampon phosphate.

50 μL de ces solution sont dispensés au moyen d'une pipette multicanaux dans chacun des 96 puits d'une microplaque de type UV-Star (Greiner, Frickenhausen, Allemagne), cette dernière étant parfaitement adaptée à la mesure d'absorbance dans le domaine ultraviolet (absorbance à 273 nm = 0,03). La microplaque est ensuite préchauffée à 37°C sous agitation orbitale à 1200 rpm dans un agitateur thermostaté (PHMT Grant Instruments Ltd, Shepreth, Angleterre) pendant 5 min.

(ii) 25 mL de solution de tampon phosphate (pH 7,2) contenant 34 μ M de Brij 35 (émulsifiant non ionique, masse moléculaire estimée : 1198 g/mol) sont ajoutés à 5 mg d'huile de tung dans un tube ambré, puis pré-agités par l'intermédiaire d'un agitateur type vortex pendant 10 sec. Immédiatement après, ce mélange est homogénéisé dans un homogénéisateur de type Ultra Turrax (Janke & Kunkel, Staufen, Allemagne) à environ 2400 rpm pendant 90 sec. Chaque puits est ensuite complété avec 100 μ L de cette émulsion d'huile de tung dans la solution de tampon phosphate. Afin d'améliorer la répétabilité, la microplaque est immédiatement préchauffée et agitée, à l'abri de la lumière, dans un agitateur thermostaté (PHMT Grant Instruments Ltd) à 37°C pendant 1 min (temps nécessaire pour préparer la solution d'AAPH) à 1200 rpm.

(iii) 50 μ L d'une solution fraîchement préparée d'AAPH en solution tampon (4 mM) sont ajoutés. Finalement, chaque puits contient 200 μ L d'un milieu final comprenant 115 μ M d'huile de tung purifiée, 17 μ M de Brij 35, 1 mM d'AAPH et des concentrations croissantes d'antioxydants (0-2 μ M) en solution de tampon phosphate. L'évolution de l'absorbance à 273 nm est immédiatement enregistrée à l'aide d'un lecteur de microplaque Saffire 2 (Tecan, Gröedig, Autriche) équipé d'un logiciel Magellan. Les mesures sont réalisées chaque min pendant 5 h à $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$ avec 5 sec d'agitation avant chaque mesure. Des analyses indépendantes utilisant des lots différents d'huile de tung ont été réalisées.

Par la suite, le signal brut d'absorbance est transformé en absorbance relative grâce à l'équation 2 suivante:

$$\text{Absorbance relative} = A_t/A_0 \quad (\text{Eq. 2})$$

où A_t et A_0 sont respectivement les absorbances lues au temps t et à 0 min. Il est à noter que, si la mesure n'est pas assez rapide après addition de la solution d'AAPH, l'absorbance initiale (A_0) obtenue en l'absence d'antioxydant (blanc) peut être bien plus faible que celle de l'échantillon contenant l'antioxydant. Dans ce cas, pour normaliser l'absorbance initiale, l'absorbance A_0 expérimentale pour le blanc peut être artificiellement remplacée par l'absorbance A_0 des échantillons dans l'équation 2.

L'aire sous la courbe (AUC) correspondant à la chute de l'absorbance relative est ensuite calculée comme suit :

$$\text{AUC} = 1 + A_1/A_0 + A_2/A_0 + \dots + A_{299}/A_0 + A_{300}/A_0 \quad (\text{Eq. 3})$$

Dans le cas d'une substance antioxydante (échantillon) dont la masse moléculaire est connue, la protection nette est calculée en utilisant la différence entre l'AUC en présence d'antioxydant ($AUC_{\text{antioxydant}}$) et l'AUC du blanc (AUC_{blanc}), ce dernier étant constitué du même mélange exempt de substance antioxydante. Le Trolox est utilisé comme composé de référence des mesures de l'activité antioxydante. La capacité antioxydante (ou valeur CAT) d'une substance antioxydante par rapport au Trolox est exprimé comme suit :

$$\text{Valeur CAT} = [(AUC_{\text{échantillon}} - AUC_{\text{blanc}}) / (AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{blanc}})] \times [\text{mol de Trolox/mol échantillon}] \text{ (Eq. 4)}$$

où ($AUC_{\text{échantillon}} - AUC_{\text{blanc}}$) et ($AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{blanc}}$) représentent respectivement les protections nettes en présence d'antioxydant et en présence de Trolox. Par ailleurs il est primordial que le Trolox soit utilisé comme référence en calibrage interne (i.e., analysé sur la même microplaque). Au final, la valeur CAT est exprimée en moles d'équivalent Trolox (ET) par mole de substance antioxydante.

Dans le cas d'un extrait végétal comme les extraits de feuilles d'olivier pour lesquels la masse moléculaire est inconnue, la protection nette est calculée en utilisant la différence entre l'AUC en présence d'antioxydant ($AUC_{\text{antioxydant}}$) et l'AUC du blanc (AUC_{blanc}), ce dernier étant constitué du même mélange exempt de l'extrait de feuilles d'olivier. Le Trolox est là aussi utilisé comme composé de référence des mesures de l'activité antioxydante. La capacité antioxydante (ou valeur CAT) d'un extrait de feuilles d'olivier par rapport au Trolox est donnée comme :

$$\text{Valeur CAT} = [(AUC_{\text{échantillon}} - AUC_{\text{blanc}}) / (AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{blanc}})] \times [\mu\text{mol de Trolox/g d'extrait sec}] \text{ (Eq. 5)}$$

où ($AUC_{\text{échantillon}} - AUC_{\text{blanc}}$) et ($AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{blanc}}$) représentent respectivement les protections nettes en présence d'antioxydant et en présence de Trolox. Au final, la valeur CAT est exprimée en μmoles d'équivalent Trolox (ET) par g d'extrait sec.

2.5. MESURE DE LA CAPACITÉ ANTIOXYDANTE PAR LA MÉTHODE DPPH

La détermination de l'activité antiradicalaire est réalisée par spectrophotométrie d'absorption selon la procédure décrite par [Brand-Williams *et al.* \(1995\)](#). Le principe de la méthode repose sur la chute d'absorbance à 515 nm du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH \bullet) suite à la réduction de son état radicalaire par une substance antiradicalaire (AOH). Les solutions de travail sont préparées comme suit : 1,95 mL d'une solution méthanolique de DPPH \bullet à 60 μM

sont placés dans une cuve en quartz. En parallèle, 50 μ L d'une solution méthanolique de substances antiradicalaires (0,154-1,15 mM) sont ajoutés dans la cuve en quartz. Ces concentrations correspondent à des ratios molaires d'AOH/DPPH \bullet s'échelonnant de 0,05 à 0,5. La chute de l'absorbance à 515 nm provoquée par la réduction du DPPH \bullet après l'addition d'AOH est enregistrée toutes les mins, à 20°C jusqu'à l'obtention d'un état stationnaire. L'équipement utilisé pour ce suivi cinétique est un spectrophotomètre Lambda 25UV (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) équipé d'un système de contrôle de température et d'agitation. L'homogénéité du milieu réactionnel est assurée par une agitation magnétique à 1000 rpm. Par ailleurs, une correction de la chute du signal du DPPH \bullet au cours du temps en absence de substance antiradicalaire est réalisée afin de s'affranchir d'une éventuelle surestimation de la capacité antiradicalaire. Dans ces circonstances, il est possible de calculer l'absorbance corrigée au cours du temps correspondant à l'action exercée par l'AOH (**équation 6**).

$$A^c = A_t + A^b_0 - A^b_t \quad (\text{Eq. 6})$$

où A^c correspond à l'absorbance corrigée de l'AOH, et A_t l'absorbance de l'AOH à chaque min de réaction, et A^b_0 et A^b_t les absorbances respectives du blanc (1,95 mL du DPPH \bullet et 50 μ L de méthanol) à 0 min et à chaque intervalle de temps.

Le pourcentage du DPPH \bullet est alors calculé selon l'**équation 7**.

$$\% \text{ DPPH} = (A^c_t / A^c_0) \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

Où A^c_0 correspond à l'absorbance corrigée de l'AOH à 0 min, et A^c_t l'absorbance corrigée à chaque intervalle de temps. Pour chaque concentration d'AOH testée, le % du DPPH \bullet restant est tracé en fonction du temps (**Fig. 33**), à partir de cette figure, il est possible de calculer le % de DPPH \bullet restant à l'état stationnaire.

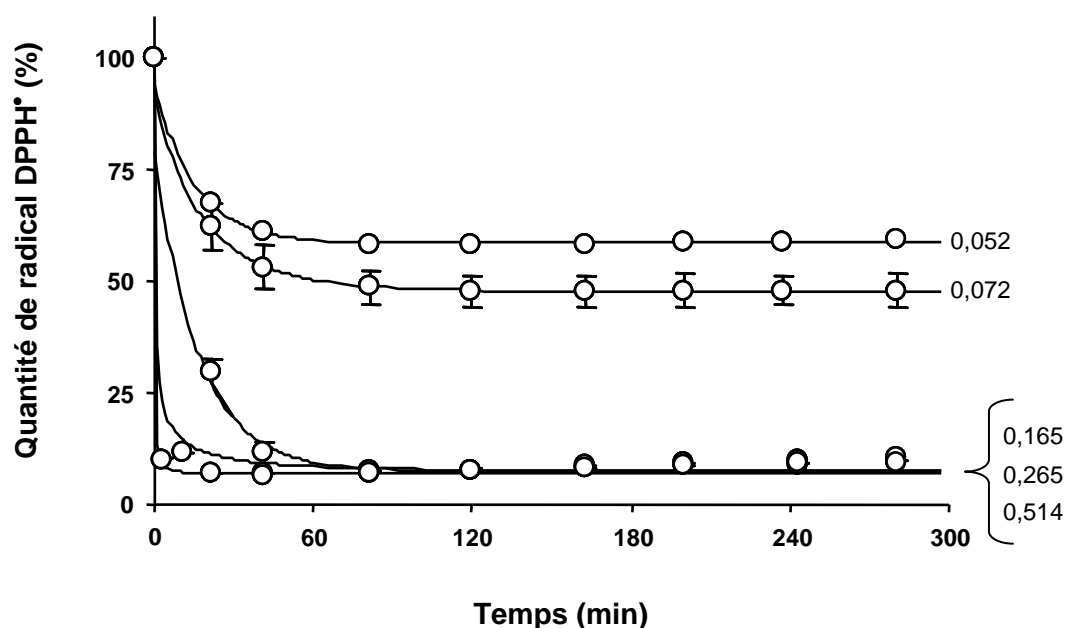


Fig. 33. Exemple de l'évolution de la quantité de radical DPPH• au cours du temps suite à l'addition de différents ratio de substances antiradicales.

Par la suite, le % de DPPH• restant à l'état stationnaire est reporté en fonction du ratio molaire d'AOH/DPPH• (Fig. 34). La capacité antiradicalaire est alors définie comme la concentration d'antioxydant nécessaire pour diminuer de 50 % la concentration initiale du DPPH• et est exprimée en EC₅₀.

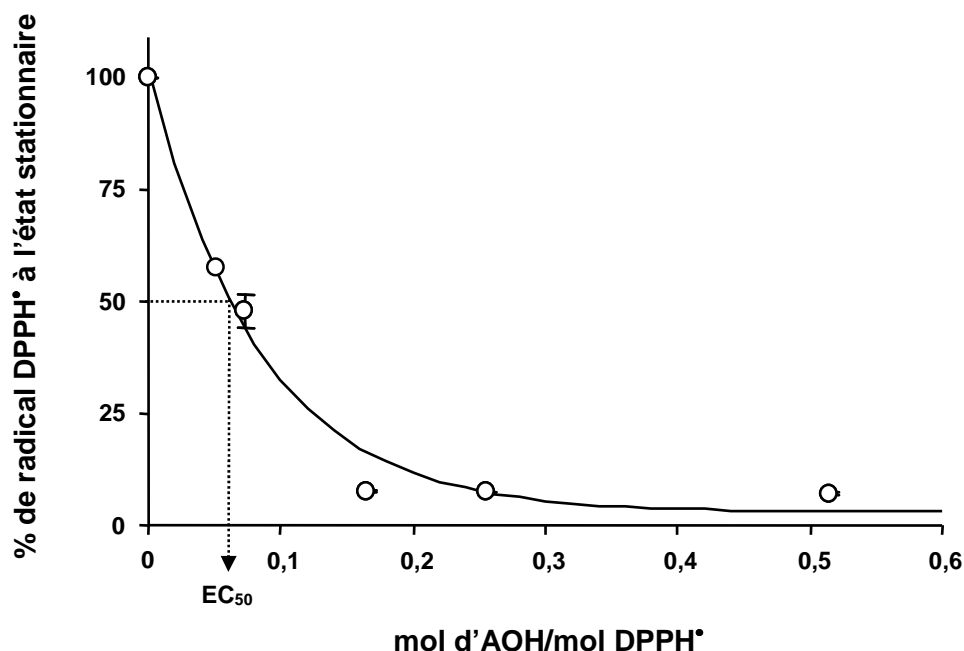


Fig. 34. Exemple de détermination de l'EC₅₀.

Afin de comparer le test DPPH avec d'autres méthodes, les résultats sont exprimés en moles de Trolox par mole de composé testé (équivalents Trolox).

2.6. MESURE DE LA CAPACITÉ ANTIOXYDANTE PAR LA MÉTHODE ORAC_{FL}

La capacité des composés phénoliques à piéger les peroxyradicaux est déterminée en utilisant une méthode adaptée de [Ou et al. \(2001\)](#). Toutes les solutions de tampon phosphate (pH 7,2) contenant les concentrations désirées d'antioxydants (de 0 à 40 μM) sont préparées extemporanément. Cinquante millilitres de chaque solution sont transférés grâce à une pipette multi-canaux dans une microplaque de 96 puits Fluotrac (Greiner). Chaque puits est ensuite complété avec 100 μL de solution de tampon phosphate, pH 7,2, contenant 0,126 μM de sel disodique de fluorescéine. Pour améliorer la répétabilité, la microplaque est préchauffée à 37°C sous agitation orbitale à 1200 rpm dans un agitateur thermostaté (PHMT Grant Instruments Ltd, Shepreth, Angleterre) pendant 20 min. Par la suite, 50 μL de solution d'AAPH en solution tampon phosphate fraîchement préparée sont ajoutés grâce à une pipette multi-canaux. Finalement, chaque puits contient 200 μL de mélange final composé de 0,063 M de sel disodique de fluorescéine, 12,7 mM d'AAPH et des concentrations croissantes d'antioxydants (de 0 à 10 μM) en solution de tampon phosphate. La chute de fluorescence à 515 nm (λ_{ex} : 490nm) est immédiatement enregistrée. Les mesures sont réalisées chaque min pendant 2 h à $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$ avec 5 sec d'agitation avant chaque mesure, avec le même lecteur de microplaque que celui utilisé dans la méthode CAT. Les résultats sont alors calculés selon [Ou et al. \(2001\)](#). Le signal brut de fluorescence est transformé en fluorescence relative grâce à l'équation 8 :

$$\text{Fluorescence relative} = F_t/F_0 \quad \text{Eq. 8)}$$

où F_t et F_0 sont respectivement les fluorescences lues au temps t et à 0 min. De manière analogue à la méthode CAT, il est à noter que, si la mesure n'est pas assez rapide après addition de la solution d'AAPH, la fluorescence initiale (F_0) obtenue en l'absence d'antioxydant (blanc) peut être plus faible que celle de l'échantillon contenant l'antioxydant. Dans ce cas, pour normaliser la fluorescence initiale, la fluorescence F_0 expérimentale obtenue pour le blanc peut être artificiellement remplacée par la fluorescence F_0 des échantillons dans l'équation 8.

L'aire sous la courbe (AUC) correspondant à la chute de l'absorbance relative est ensuite calculée comme suit (équation 9) :

$$AUC = 1 + F_1/F_0 + F_2/F_0 + \dots + F_{119}/F_0 + F_{120}/F_0 \quad \text{Eq. 9)}$$

La protection nette fournie par la substance antioxydante (échantillon) est calculée en utilisant la différence entre l'AUC en présence d'antioxydant ($AUC_{\text{antioxydant}}$) et l'AUC du blanc (AUC_{blanc}), ce dernier étant constitué du même mélange exempt d'antioxydant. Le Trolox est utilisé comme composé de référence des mesures de l'activité antioxydante. La capacité antioxydante (ou valeur $ORAC_{FL}$) d'une substance antioxydante par rapport au Trolox est obtenue comme suit (**équation 10**) :

$$\text{Valeur } ORAC_{FL} = [(AUC_{\text{échantillon}} - AUC_{\text{blanc}}) / (AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{blanc}})] \times [\text{mol de Trolox/mol échantillon}] \quad \text{Eq. 10)}$$

où $(AUC_{\text{extrait}} - AUC_{\text{blanc}})$ et $(AUC_{\text{Trolox}} - AUC_{\text{blanc}})$ représentent respectivement les protections nettes en présence d'antioxydant et en présence de Trolox. Par ailleurs il est primordial que le Trolox soit utilisé comme référence en calibrage interne (i.e., analysé sur la même microplaque). Au final, la valeur $ORAC_{FL}$ est exprimée en moles d'équivalent Trolox (ET) par mole de substance antioxydante.

2.7. DÉTERMINATION THÉORIQUE DU LOG D

Le $\log D$ correspond au ratio des concentrations de toutes les espèces (ionisées ou neutres) d'une molécule dans l'octanol par rapport aux concentrations de ces mêmes espèces présentes dans une phase aqueuse à une température donnée (ici 25 °C). Par conséquent, le $\log D$ diffère du $\log P$ du fait que les espèces ionisées sont prises en compte au même titre que la forme neutre de la molécule. Le $\log D$ a été calculé à partir du logiciel gratuit ChemSilico (<http://www.chemsilico.com/>).

3. TESTS SUR CULTURES CELLULAIRES

3.1. CELLULES EMPLOYÉES ET CONDITIONS DE CULTURE

Les cultures cellulaires sont réalisées sur des fibroblastes du derme humain modifiés génétiquement pour accroître la production d'espèces oxydantes d'origine mitochondriale. Ces cellules ont été fournies par le Dr G. Cabello. Elles ont été cultivées à 37°C sous atmosphère à 5 % de CO₂ et 100 % d'humidité. Le milieu de culture est constitué de DMEM supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal, 50 µg/mL de gentamicine et 50 µg/mL d'amphotéricine B.

3.2. PRÉPARATION DES CULTURES CELLULAIRES EN MICROPLAQUE 96 PUIITS

Des microplaques 96 puits noires à fond plat et transparent (Greiner, Frickenhausen, Allemagne) sontensemencées à une densité cellulaire de 3000 ou 10 000 cellules/puits au moyen d'une micropipette multi-canaux ; le comptage cellulaire étant effectué sur la cellule de Thoma. Les cellules sont cultivées dans le milieu de culture précédemment décrit.

3.3. TRAITEMENTS AVEC LES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

Les composés phénoliques (acide 5-caféoylquinique, caféoylquininate de méthyle, de butyle, d'octyle, de dodécyle et d'hexadécyle) étant de nature hydrophile ou lipophile selon qu'ils soient estérifiés ou non, une mise en solution dans l'éthanol est effectuée aux concentrations désirées. 2 µL de ces solutions sont par la suite additionnés à 2 mL de milieu de culture pour obtenir des concentrations finales de 0, 10, 25, 50 ou 100 µM. Puis, 100 µL/puits de ce milieu de culture contenant les composés phénoliques sont dispensés dans une microplaque de 96 uits à l'aide d'une micropipette multi-canaux, 24 h après ensemencement des cellules. Le milieu de culture final contient donc 0,1 % (vol) d'éthanol et 0, 10, 25, 50 ou 100 µM de composés phénoliques. La mesure de chaque concentration est répétée sur quatre microplaques différentesensemencées à partir de passages¹³ cellulaires différents ; chaque microplaque comprenant déjà un triplicat de la concentration (4 x 3 répétitions).

¹³ Un passage cellulaire correspond au repiquage des cellules dans une nouvelle flasque avec du milieu de culture neuf.

3.4. MESURE DE LA CAPACITÉ ANTIOXYDANTE DE L'ACIDE 5-CAFÉOYLQUINIQUE ET DE SES ESTERS ALKYLQUES

3.4.1. Synthèse des esters alkylques d'acide 5-caféoylquinique

Dans un ballon à fond plat, 10 mmol d'acide 5-caféoylquinique sont dissous dans 240 mL de méthanol. Après solubilisation complète, 10 g de catalyseur (Amberlite IR 120 H), préalablement séché à 110°C pendant 48 h, sont ajoutés dans le milieu afin de réaliser l'estérification sous catalyse acide. Le milieu réactionnel est incubé à 55°C sous agitation orbital (250 rpm). La réaction est alors arrêtée en retirant le catalyseur du milieu de réaction par filtration sur microfibres de verre de 1,6 µm (Whatman international Ltd., Maidston, England). Le filtrat est évaporé à 40°C sous vide (40 mmHg) à l'aide d'un évaporateur rotatif. 150 mL de chloroforme sont ensuite ajoutés. Ce milieu organique est filtré en présence de sulfate de sodium afin d'éliminer les traces d'eau éventuelles puis évaporé à 40°C sous vide (40 mmHg). Un solide jaune est obtenu.

Par la suite, le transfert d'acyle d'alcool libre au 5-caféoylquinate de méthyle, est réalisé à l'abri de la lumière dans des flacons ambrés contenant 56 µmol de substrat et 10 mL d'alcool gras (alcools butylique (109,3 mmol), octylique (63,5 mmol), dodécylique (44,7 mmol) et hexadécyliqueC16 (33,4 mmol)). Avant l'ajout de l'enzyme, ces milieux réactionnels sont placés pendant 2 h dans des incubateurs thermostatés (55°C) sous agitation orbitale (250 rpm) (Stuart SI50, Montferrier, France) afin d'optimiser la solubilisation des composés. Après ce temps d'incubation, la réaction est alors initiée par addition de la lipase de *Candida antarctica* B (10 % p/p du total des subtrats, dont l'a_w a été préalablement équilibrée à 0,05 à l'aide de sels saturés référence Dans le but d'orienter les réactions vers la synthèse, le co-produit (méthanol) formé au cours de la réaction est éliminé par l'intermédiaire d'un débit d'azote.

Une fois la réaction terminée, le biocatalyseur est retiré par filtration à travers un filtre en microfibres de verre de 1,6 µm (Whatman international Ltd., Maidston, England). Par la suite, une étape de séparation par extraction liquide-liquide est effectuée en utilisant comme solvant un mélange de 500 mL d'hexane/acétonitrile (1 : 3 v/v). Une fois l'équilibre des phases atteint, la phase hexanique contenant la majorité de l'alcool gras est éliminée, tandis que la phase acétonitrile contenant principalement les esters est lavée 3 fois avec 100 mL d'hexane. Après ces lavages, la phase acétonitrile est évaporée à 40°C sous pression réduite (40 mmHg) à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le produit sec obtenu est alors dissout dans 60 ml d'un mélange toluène/acétate d'éthyle (70 : 30, v/v) puis déposé sur une colonne en verre (φ : 0,3 mm ; hauteur : 50 cm) chargée de silice activée. La séparation sur colonne est

accomplie en passant ~ 1,5 L du mélange toluène/acétate d'éthyle (70 : 30, v/v). Finalement les fractions contenant les esters sont recueillies et le solvant est évaporé à 40°C sous pression réduite (40 mmHg).

3.4.2. Identification des esters alkylques d'acide 5-caféoylquinique

Après purification, la synthèse des esters d'acide 5-caféoylquinique est confirmée par spectrométrie de masse. L'analyseur de masse utilisé est équipé d'une trappe d'ions quadripôle, une source d'ionisation externe opérant à pression atmosphérique munie d'un système d'injection intégré (Thermo Finnigan Serie LCQ, San José CA, USA). Les esters alkylques d'acide 5-caféoylquinique sont préalablement dissous dans du méthanol à 10 mg/L. Par la suite, les solutions sont injectées par infusion à l'intérieur d'une source d'ionisation par électro-nébulisation qui opère en conditions de fragmentation négative à un débit de 5 µL/min. L'acquisition des données est effectuée en mode balayage, mais également en fragmentation de l'ion parent (mode SM²) et des ions fils (mode SM³). Les conditions opératoires ont été optimisées en suivant la procédure décrite par [Clifford *et al.* \(2003\)](#). Ainsi, les conditions optimales obtenues sont : courant d'ionisation : 4,54 kV ; température du capillaire : 250°C ; débit d'azote : 20 (unités arbitraires) ; énergie de collision employée pour l'acquisition en mode SMⁿ : 35 %.

3.4.3. Mesure des espèces oxydantes par la 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine-diacétate

La 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine-diacétate est un dérivé non fluorescent de la 2',7'-dichlorofluorescéine. Une fois internalisée, la fonction ester est hydrolysée par des estérases pour générer la 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine, qui va former un composé fluorescent, la 2',7'-dichlorofluorescéine après oxydation par les espèces oxydantes. Après exposition à différentes concentrations d'acide 5-caféoylquinique et de ses esters alkylques, la fluorescence résultante (λ_{ex} : 500/ λ_{em} : 525 nm) a été mesurée par spectrofluorimétrie. Plus la fluorescence est importante, plus le milieu intracellulaire est oxydant.

Après 24, 48 ou 72 h d'incubation avec les composés phénoliques, le milieu est retiré par simple retournement de la microplaque. Les cellules adhérentes sont lavées deux fois avec 50 µL/puits d'une solution de tampon de Locke (140 mM NaCl ; 5 mM KCl ; 1,2 mM MgCl₂ ; 1,8 mM CaCl₂ ; 10 mM D-glucose ; 10 mM d'acide hydroxyéthylpypérazineéthane (HEPES)), laquelle est éliminée par retournement. 100 µL/puits de tampon de Locke sont finalement additionnés aux cellules adhérentes. Une lecture (λ_{ex} : 485/ λ_{em} : 530) consistant en

la mesure de la fluorescence du bruit de fond est réalisée sur un spectrofluorimètre à microplaque (Synergy 2 BioTek, Bio-tek Instruments, Inc., Winooski, USA).

Pour chaque microplaque, une solution fille de 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine-diacétate est préparée extemporanément comme suit : 10 µL d'une solution stock de 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine-diacétate à 10 mM dans le diméthylsulfoxyde sont ajoutés à 10 mL de tampon de Locke (concentration finale 100 µM). Après élimination par retournement du tampon de Locke ayant servi à la lecture, 100 µL/puits de la solution fille de 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine-diacétate sont dispensés à l'aide d'une micropipette multi-canaux et à l'abri de la lumière (lumière de la hotte éteinte). La plaque immédiatement recouverte d'un papier d'aluminium est incubée durant 20 min à 37°C. Après 20 min, la solution contenant la sonde fluorogénique est éliminée par retournement, chaque puits est lavé deux fois avec 50 µL de tampon de Locke et finalement additionné de 100 µL/puits de la même solution. La microplaque recouverte d'un papier aluminium est mise à incuber à 37°C durant 10 min, durée après laquelle, la fluorescence de la microplaque est mesurée (λ_{ex} : 485/ λ_{em} : 530).

La fluorescence brute pour chaque puits est ensuite calculée en soustrayant la fluorescence obtenue en présence de la sonde fluorogénique par celle du bruit de fond (cellules sans sonde) (**équation 11**).

$$\text{Fluorescence brute} = \text{Fluorescence (cellules avec sonde)} - (\text{cellules sans sonde}) \quad (\text{Eq. 11})$$

Par ailleurs, considérant que les substances testées sont susceptibles d'influencer la croissance cellulaire, une correction de la fluorescence de la 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine par la quantité d'ADN (exprimée en µg d'ADN/puits ; cf. section 3.4.4.) est effectuée en utilisant l'**équation 12**.

$$\text{Fluo}_{\text{DCHF-DA}} \text{ corrigée} = \text{Fluo}_{\text{DCHF-DA}} \text{ brute} / \text{Quantité d'ADN (en } \mu\text{g) par puits} \quad (\text{Eq. 12})$$

Enfin, dans le but de prendre en compte l'effet potentiellement inhibiteur de l'éthanol, la fluorescence corrigée est exprimée en pourcentage du contrôle effectué en présence d'éthanol (**équation 13**).

$$\text{Fluo}_{\text{DCHF-DA}} (\% \text{ du contrôle}) = (\text{Fluo}_{\text{DCHF-DA}} \text{ corrigée} \times 100) / \text{Fluo}_{\text{DCHF-DA}} \text{ du contrôle} \quad (\text{Eq. 13})$$

Les capacités antioxydantes consistent donc en un pourcentage d'inhibition de l'apparition de 2',7'-dichlorofluorescéine en présence de la substance testée par rapport au contrôle sans

antioxydant mais contenant l'éthanol ; ces capacités antioxydantes étant rapportées à la quantité d'ADN en µg/puits.

Enfin, tenant compte du fait que la 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine-diacétate est photosensible, une mesure de contrôle de la microplaque après 20 min est réalisée. Une augmentation de fluorescence témoigne que l'intensité de la fluorescence est dépendante du temps d'incubation, tandis qu'une chute de fluorescence après 20 min suggère une dégradation oxydative de la 2',7'-dichlorofluorescéine. Après cette mesure, la solution de tampon Locke baignant les cellules adhérentes est éliminée par retournement, la microplaque est ensuite stockée à - 20°C jusqu'à l'étape de quantification de l'ADN.

3.4.4. Quantification de l'ADN par le réactif de Hoechst 33258

La quantité d'ADN par puits est mesurée en appliquant la méthode au réactif de Hoechst 33258 de [De Arcangelis et al. \(2005\)](#) avec quelques modifications. Le Hoechst 33258 est un fluorochrome spécifique de l'adénine et de la thymine exerçant une fluorescence intense (~ 440 nm) lorsqu'il est fixé à l'ADN et excité vers 340 nm. La fluorescence émise est proportionnelle à la quantité d'ADN, mais dépend également de sa séquence.

Le contenu cellulaire des puits ayant servi à la mesure des espèces réactives est lysé (immédiatement après leur sortie du congélateur) avec 100 µL/puits d'une solution de tampon TE5N (10 Mm Tris-HCl ; pH 8 ; 0,1 mM EDTA et 0,5 M NaCl) de Triton X-100 à 0,05 %, dispensés à l'aide d'une micropipette multi-canaux. La solution de lyse est incubée durant 10 min sous agitation orbitale à température ambiante. Par la suite, 100 µL/puits d'une solution de Hoechst 33258 à 0,4 µg/mL dans le TE5N sont ajoutés aux lysats, puis mis à incuber à température ambiante durant 30 min, à l'abri de la lumière (papier aluminium). La fluorescence (λ_{ex} : 340/ λ_{em} : 440 nm) est ensuite lue au moyen d'un fluorimètre à microplaques (Synergy 2 BioTek, Bio-tek Instruments, Inc., Winooski, USA).

Par ailleurs, la fluorescence d'une gamme d'ADN de sperme de saumon (0 ; 0,5 ; 1 ; 2 et 4 µg/mL de TE5N) mise à incuber avec 100 µL de la même solution de Hoechst 33258 dans le TE5N, a été analysée sur une plaque séparée. Notons qu'il est important que la gamme d'ADN soit préparée dans la même solution TE5N que les échantillons.

Tout d'abord, toutes les valeurs de fluorescence sont soustraites par la valeur de fluorescence correspondante à une concentration de 0 µg/mL d'ADN de sperme de saumon (**équation 14**).

$$\text{Fluo}_{\text{Hoechst}} \text{ corrigée} = \text{Fluo}_{\text{Hoechst}} \text{ brute} - \text{Fluo}_{\text{Hoechst}} (0 \text{ µg/mL d'ADN}) \quad (\text{Eq. 14})$$

Par ailleurs, une régression linéaire est établie entre les concentrations de la gamme étalon et la fluorescence (exprimée en RFU, unités de fluorescence arbitraires). Une fois ces valeurs soustraites par le bruit de fond fluorescent, la concentration d'ADN correspondante à la fluorescence est obtenue à partir de la pente de la droite d'étalonnage comme suit (**équation 15**) :

$$\text{Concentration en ADN } (\mu\text{g/mL}) = \text{Fluo}_{\text{Hoechst}} \text{ corrigée} / \text{pente de la droite d'étalonnage} \quad (\text{Eq. 15})$$

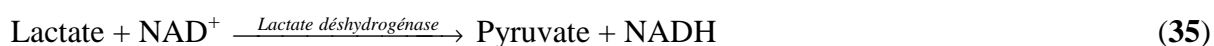
La quantité d'ADN (en μg) par puits est ensuite calculée en prenant en compte le volume total de solution dans un puits (200 μL) (**équation 16**).

$$\text{Quantité d'ADN (en } \mu\text{g) par puits} = (\text{Concentration en ADN } (\mu\text{g/mL}) \times 200) / 1000 \quad (\text{Eq. 16})$$

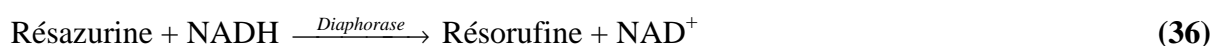
Cette quantité d'ADN intègre ensuite l'**équation 12** de la section 3.4.3. relative au calcul de capacité antioxydante.

3.5. MESURE DE LA CYTOTOXICITÉ DE L'ACIDE 5-CAFÉOYLQUINIQUE ET DE SES ESTERS ALKYLQUES

La lactate déshydrogénase est une enzyme cytoplasmique présente dans toutes les cellules mammifères et qui est rapidement libérée dans le milieu extracellulaire suite à la dégradation de la membrane cytoplasmique. Plus cette quantité est importante, plus la cytotoxicité de la substance testée est élevée. La cytotoxicité a été estimée au moyen d'un kit de détection (CytoTox-ONE G7891, Promega, Madison, USA) enzymatique qui comporte trois substrats (le NAD^+ , le lactate et la résazurine) et une enzyme, la diaphorase. Le principe de la mesure repose sur la transformation dans le milieu extracellulaire du lactate en pyruvate par la lactate déshydrogénase, cette réaction étant couplée à la réduction du NAD^+ en NADH (**réaction 35**).



Le NADH ainsi formé va permettre à la diaphorase de transformer la résazurine en résorufine qui est un composé fluorescent (λ_{ex} : 560/ λ_{em} : 590 nm) (**réaction 36**).



La génération de résorufine et donc l'apparition de fluorescence est proportionnelle à la quantité de lactate déshydrogénase présente dans le milieu.

Après 24, 48 ou 72 h d'incubation avec les composés phénoliques, les microplaques sont retirées de l'étuve et mises à équilibrer à température ambiante durant 30 min. 100 µL/puits de réactif CytoTox-ONE sont distribués au moyen d'une micropipette multi-canaux. La microplaque est mise à incuber à l'abri de la lumière durant 10 min à température ambiante (~ 25°C). Après 10 min, 50 µL/puits de solution « stop » sont ajoutés et la fluorescence est immédiatement mesurée (λ_{ex} : 560/ λ_{em} : 590 nm).

Puisque les séra utilisés dans les milieux de culture peuvent contenir de la lactate déshydrogénase, une mesure de la fluorescence du milieu de culture (DMEM supplémenté à 10 % de sérum) sans cellule est réalisée sur la même microplaque et constitue la fluorescence du bruit de fond du milieu.

La fluorescence corrigée est ensuite calculée en soustrayant à la fluorescence sur culture cellulaire, la fluorescence du bruit de fond du milieu (**équation 17**).

$$\text{Fluo}_{\text{LDH}} \text{ corrigée} = \text{Fluo}_{\text{LDH}} \text{ brute (avec cellules)} - \text{Fluo}_{\text{LDH}} \text{ bruit de fond (sans cellule)} \quad (\text{Eq. 17})$$

Par ailleurs, tenant compte du fait que les composés phénoliques sont susceptibles d'influencer la croissance cellulaire et donc d'abaisser la quantité de LDH libérable, une correction des valeurs est opérée en considérant la quantité totale de lactate déshydrogénase présente dans les milieux extra- et intracellulaires. Pour cela, un certain nombre de puits contenant des cellules est exposé à 2 µL d'une solution de lyse totale (solution de tampon phosphate à 9 % (vol) de Triton X-100) destinée à structurer les membranes de toutes les cellules et donc à libérer la totalité de la lactate déshydrogénase. Les puits de la microplaque dédiés à cette opération de lyse totale sont, par la suite, traités de la même manière que ceux n'ayant pas été exposés à cette solution de lyse. Le pourcentage de cytotoxicité absolue d'un composé phénolique est obtenu en divisant la fluorescence corrigée sans solution de lyse par la fluorescence corrigée obtenue après lyse totale, le rapport étant finalement multiplié par 100 (**équation 18**).

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = 100 \times [\text{Fluo}_{\text{LDH}} \text{ corrigée (sans solution de lyse)} / \text{Fluo}_{\text{LDH}} \text{ corrigée (avec solution de lyse)}] \quad (\text{Eq. 18})$$

D'autre part, pour prendre en compte l'influence potentielle de l'éthanol sur la mesure, cette toxicité est ensuite exprimée en pourcentage du contrôle (sans composé phénolique, avec éthanol) (**équation 19**).

$$\text{Cytotoxicité (\% du contrôle)} = \text{Cytotoxicité (\%)} / \text{cytotoxicité du contrôle} \quad (\text{Eq. 19})$$

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Développement, validation et application de la méthode CAT

1. DÉVELOPPEMENT, VALIDATION ET APPLICATION DE LA MÉTHODE CAT

Aujourd'hui, le développement de méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes de molécules pures ou en mélange au sein d'extraits végétaux représente un véritable défi, notamment en termes de pertinence, de rapidité, de facilité de mise en œuvre et de fiabilité.

Comme nous l'avons précédemment abordé, la stratégie de mesure la plus simple consiste à mesurer, en l'absence de substrat oxydable, la capacité d'une molécule à réduire un radical libre. Cette approche dite *non compétitive* est généralement plus facile à mettre en œuvre que celle impliquant un substrat oxydable. Elle présente néanmoins l'inconvénient de ne pas mettre en compétition l'antioxydant et le substrat oxydable vis-à-vis des espèces oxydantes, ce qui la rend discutable en termes de représentativité des phénomènes naturels d'antioxydation. Ainsi, bien que ces méthodes fournissent de précieuses informations quant à la réactivité intrinsèque de substances antiradicalaires, elles ne tiennent pas compte du fait qu'en conditions réelles, la seule réduction d'espèces oxydantes n'est pas suffisante pour contrer l'oxydation. En effet, seul un piégeage rapide et à proximité des substrats cibles de l'oxydation (lipides, protéines, acides nucléiques, ...) permet de protéger ces derniers.

À l'opposé de la stratégie *non-compétitive*, celle dite *compétitive* met en œuvre un substrat oxydable et consiste à mesurer l'effet inhibiteur d'une substance sur l'oxydation naturelle ou artificielle de ce substrat. D'un point de vue cinétique, deux approches de mesure peuvent être employées : (i) la mesure de la formation des produits d'oxydation et (ii) la mesure de la disparition du substrat oxydable.

(i) Bien que les méthodes compétitives basées sur la mesure des produits d'oxydation présentent de nombreux avantages, elles sont néanmoins limitées par le fait qu'il n'existe pas de marqueur universel d'oxydation. Ainsi, dans le cas spécifique des lipides polyinsaturés, l'oxydation conduit à la formation de produits d'oxydation primaire (hydroperoxydes et diènes conjugués), qui sont ensuite oxydés en composés d'oxydation secondaire (aldéhydes par exemple), lesquels peuvent encore réagir avec l'ADN ou avec les fonctions amines libres des phospholipides membranaires et des protéines. Dans ce contexte, un produit d'oxydation peut être considéré comme un nœud d'un réseau dynamique de réactions complexes subissant diverses influences en amont et en aval. Or, ce « réseau réactionnel » représente un véritable défi pour l'analyste désireux de mesurer l'étendue de l'oxydation dans un tel système et le confronte à un dilemme. En effet, se focaliser sur un ou deux produits d'oxydation relève d'une approche mono-dimensionnelle et ne permet pas d'obtenir une image complète de

l'étendue de l'oxydation, tandis que la prise en compte de nombreux produits d'oxydation est une approche fastidieuse bien souvent incompatible avec l'objectif de haut débit.

(ii) À l'opposé, l'autre approche cinétique se base sur la mesure de la disparition du substrat. Parmi les méthodes basées sur cette stratégie, certaines ont été critiquées en raison du très large excès de l'antioxydant par rapport au substrat oxydable, ce qui est irréaliste au regard du phénomène naturel d'antioxydation. En effet, ces tests ne mesurent pas une activité antioxydante comme définie par Halliwell et Gutteridge (1995) et selon lesquels un antioxydant est « *une substance qui, en faible concentration par rapport au substrat, inhibe ou prévient l'oxydation de ce dernier* ». D'autre part, le substrat oxydable utilisé dans ce type de test, doit être facilement quantifiable, généralement au moyen d'une mesure spectrale. Cette limitation a conduit à l'utilisation de substrats fluorophores (sel disodique de fluorescéine, sonde C11-BODIPY^{581/591}, BODIPY^{665/676}, ...) et/ou chromophores, qui sont pour l'essentiel non représentatifs des substrats rencontrés dans les aliments ou les milieux biologiques. Cette absence de représentativité limite par conséquent la pertinence des résultats obtenus, des conclusions qui en découlent et de leur transposition à d'autres contextes.

En tenant compte de ces considérations, une méthode de mesure de l'activité antioxydante fiable et pertinente doit, entre autre, employer un substrat naturel dont l'oxydation peut être mesurée par des méthodes courantes, notamment spectrales. Dans un deuxième temps, le test doit mettre en œuvre un excès de substrat par rapport à l'antioxydant. Dans ce contexte, nous décrivons ici la mise au point d'une nouvelle méthode de mesure de l'activité antioxydante appelée test des triènes conjugués autoxydables (CAT pour *conjugated autoxidizable triene*).

De prime abord, les objectifs de cette étude ont été :

- (i) d'adopter une approche analytique mettant en jeu une compétition entre le substrat oxydable et l'antioxydant pour réduire les espèces oxydantes.
- (ii) de mesurer la disparition d'un substrat unique et non la formation d'une multitude de produits d'oxydation, ce qui permet de renseigner l'oxydation de manière directe et non biaisée,
- (iii) de mettre en œuvre un système hétérogène permettant de tester des antioxydants de nature lipophile et hydrophile,
- (iv) d'employer un substrat oxydable représentatif de ceux rencontrés dans les aliments et les milieux biologiques.

1.1. MÉTHODOLOGIE ET OPTIMISATION DES CONDITIONS OPÉRATOIRES

La mise au point d'un test de mesure de la capacité antioxydante suppose un certain nombre de choix initiaux, parmi lesquels nous nous focaliserons sur le type de système, la stratégie de mesure de l'oxydation ainsi que la nature du substrat oxydable. Une optimisation des différents paramètres opératoires, associée à une application de la méthode à l'étude de la capacité antioxydante de quatre composés phénoliques, sera par la suite présentée.

1.1.1. Choix du système et de la stratégie de mesure de l'oxydation

D'emblée, il est évident que les méthodes non compétitives, comme le test DPPH, ne satisfont pas le premier objectif précédemment formulé. D'autre part, les milieux hétérogènes naturels mettent essentiellement en jeu des phospholipides (ou dérivés structurellement proches) organisés en monocouche (LDL), bicouche (membrane cytoplasmique), ou double bicouche (membrane mitochondriale). Or, la complexité de ces systèmes (en termes de structure et de composition) rend difficile leur mise en œuvre dans un test de mesure de la capacité antioxydante. Aussi, nous sommes nous orientés vers des systèmes émulsionnés qui sont plus simples d'emploi, mais néanmoins représentatifs des milieux compartimentés. Se pose alors la question de la nature des constituants de l'émulsion, de leurs proportions relatives et de leur mise en œuvre.

1.1.2. Choix du substrat oxydable

La recherche de substrats oxydables naturels dont la dégradation oxydative est mesurable par des méthodes rapides et continues (i.e. mesure spectrale) représente un véritable défi pour l'analyste, notamment dans la mise en œuvre de systèmes émulsionnés. En effet, peu de lipides naturels présentent les propriétés spectrales apportées par un système d'insaturations conjuguées, ce qui limite le choix de manière drastique.

Parmi eux, le plus connu est certainement l'acide *cis*-parinarique contenant quatre doubles liaisons conjuguées et fluoresçant dans le domaine visible (λ_{ex} : 326/ λ_{em} : 410-413 nm). Cependant, seuls l'acide *cis*-parinarique libre ou son ester méthylique sont disponibles dans le commerce, en solution avec un antioxydant de surcroît. Or, [Frankel \(1998\)](#) et [Decker *et al.* \(2005\)](#) ont reporté que les acides gras libres ne représentaient pas des substrats lipidiques adéquats pour ce type de test, arguant du fait qu'ils forment des micelles mixtes avec l'antioxydant, lesquelles se comportent différemment des gouttelettes d'huile. En d'autres termes, leur utilisation ne permet pas d'obtenir une émulsion dans laquelle l'antioxydant se

répartit en fonction de sa polarité, mais conduit seulement à une dispersion de l'antioxydant et de l'acide gras. Pour réaliser l'émulsion souhaitée, le substrat oxydable doit être un triacylglycérol. Cependant, à notre connaissance, il n'existe aucune source commerciale de triacylglycérols contenant des quantités importantes d'acide *cis*-parinarique. En outre, l'extraction d'huile à partir des graines de parinari est laborieuse, principalement en raison de la dureté de la coque.

En marge de l'acide *cis*-parinarique, d'autres substrats lipidiques comportant un système d'insaturations conjuguées ont été décrits dans la littérature. Parmi eux, les acides gras polyinsaturés comportant trois doubles liaisons conjuguées (triène conjugué) ont été largement étudiés en raison de leurs propriétés spectrales dans le domaine ultraviolet qui se manifestent, pour la majorité d'entre eux, sous la forme d'un pic trifide comportant trois maxima. Bien que le nombre d'isomères d'acides octadécatriénoïques conjugués soit très grand en raison des multiples possibilités de positions et de configurations des doubles liaisons, seulement une dizaine d'entre eux a été identifiée dans la nature. Il s'agit des acides α - et β -éléostéarique, punique, catalpique, calendique, jacarandique, α - et β -kamlolénique et α - et β -licanique (**Tableau 1**).

| Nom trivial | Configuration | Formule développée |
|-------------------------|---------------------------|---|
| α -Éléostéarique | 18:3 ; 9(c), 11(t), 13(t) | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$ |
| β -Éléostéarique | 18:3 ; 9(t), 11(t), 13(t) | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$ |
| Punique | 18:3 ; 9(c), 11(t), 13(c) | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$ |
| Catalpique | 18:3 ; 9(t), 11(t), 13(c) | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$ |
| Calendique | 18:3 ; 8(t), 10(t), 12(c) | $\text{CH}_3(\text{CH}_4)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_6-\text{COOH}$ |
| Jacarandique | 18:3 ; 8(c), 10(t), 12(c) | $\text{CH}_3(\text{CH}_4)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_6-\text{COOH}$ |
| α -Kamlolénique | 18:3 ; 8(c), 10(t), 12(t) | $\text{HO}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$ |
| β -Kamlolénique | 18:3 ; 8(t), 10(t), 12(t) | $\text{HO}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$ |
| α -Licanique | 18:3 ; 9(c), 11(t), 13(t) | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$ |
| β -Licanique | 18:3 ; 9(t), 11(t), 13(t) | $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$ |

Tableau 1. Principaux acides gras triénoïques conjugués rencontrés dans la nature. D'après Solodovnik (1967).

D'après Solodovnik (1967), l'acide α -éléostéarique est l'acide triénoïque conjugué le plus répandu dans la nature. En termes de source végétale, les deux huiles qui en contiennent le plus sont celles issues de *Garcia nutans* (~ 89 %) (Jamieson et Rose, 1943) et d'*Aleurites*

fordii (~ 75 %). Bien que très riche en acide α -éléostéarique, l'huile de *Garcia nutans* est issue d'une plante de la famille des euphorbiaceae qui est sur la liste rouge des espèces protégées. Par conséquent, cette huile n'est pas disponible dans le commerce, ce qui est incompatible avec une utilisation courante en laboratoire. En revanche, l'huile issue des graines d'*Aleurites fordii*, plus connue sous le nom d'huile de bois de Chine (ou huile de tung) est largement commercialisée, notamment en raison de ses propriétés siccatives. En effet, son utilisation dans la fabrication des laques chinoises et dans l'étanchéification de constructions ou de vêtements est très ancienne comme en attestent les écrits de Confucius, vers 400 avant JC. Cette huile contiendrait jusqu'à 80 % d'acide α -éléostéarique. Cependant, la double liaison 9(*cis*) peut rapidement s'isomériser en sa forme 9(*trans*), ce qui conduit à une conversion de l'acide α -éléostéarique en son isomère, l'acide β -éléostéarique. En raison de cette possible isomérisation, leur teneur respective peut légèrement fluctuer d'une étude à l'autre. Ainsi, [Holmes et al. \(1954\)](#) ont déterminé des teneurs relatives de 78 % d'acide α -éléostéarique et de 1 % de la forme β , tandis que [Tsuzuki et al. \(2004\)](#) ont obtenus des teneurs de 72 % pour la forme α et 3 % pour la forme β .

Compte tenu des propriétés spectrales des acides gras triénoïques conjugués, l'huile de tung semble constituer un substrat oxydable potentiellement sensible, bon marché et pertinent. En considérant que les TAGs sont majoritairement rencontrés à côté des phospholipides dans les milieux alimentaires et biologiques, ils représentent de ce fait, l'une des cibles de l'oxydation les plus représentatives ([Frankel, 1998](#)).

En préambule à l'utilisation de l'huile de tung comme substrat d'oxydation modèle, une caractérisation de sa composition et de ses propriétés spectrales a été réalisée.

1.1.3. Propriétés chimiques de l'huile de tung

La caractérisation de l'huile de tung a montré que l'acide α -éléostéarique est l'acide gras majoritaire (~ 73 %), suivi des acides linoléique (~ 6 %), oléique (~ 4%), stéarique (~ 2 %), palmitique (~ 2 %) et gadoléique (~ 0,5 %) (**Tableau 2**). Ce résultat confirme ceux préalablement obtenus par [Holmes et al. \(1954\)](#) et [Tsuzuki et al. \(2004\)](#). Par ailleurs, comme la détermination de la composition en acides gras passe par une étape de méthylation à reflux (65°C), une isomérisation de type *cis/trans* peut se produire et engendrer la conversion d'une part significative de l'acide α -éléostéarique en son isomère β . Dans ce contexte, la prise en compte de l'ensemble des acides éléostéariques (~ 86 %) à la place du seul isomère α semble plus appropriée. Ainsi, l'huile de tung renfermerait 86 % d'un mélange d'isomères d'acide

éléostéarique, majoritairement composé de l'isomère α (84 % du total des acides éléostéariques, **Tableau 2**).

Dans un deuxième temps, le profil HPLC (données non présentées) a montré que la triéléostéarine était le triacylglycérol majoritaire (~ 77 %) (**Fig. 35**), suivie du diéléostéaroylinoléoylglycérol (~ 11 %). Ce résultat est à mettre en relation avec notre étude de la régio-distribution des AGs réalisée en utilisant la lipase pancréatique de porc *sn-1,3*-régiospécifique (**Tableau 2**) et montrant que les acides éléostéariques, en particulier l'isomère α , étaient préférentiellement estérifiés en positions externes, tandis que l'acide linoléique était exclusivement estérifié en position interne sur les TAGs d'huile de tung. De ce fait, le diéléostéaroylinoléoylglycérol a été caractérisé comme étant sous la forme de *sn-1,3*-diéléostéaroyl-*sn-2*-linoléoylglycérol.

| Acide gras | Total | Position interne ^a | Position externe ^a |
|-------------------------|-------|-------------------------------|-------------------------------|
| Palmitique | 1,6 | 1,0 | 1,9 |
| Stéarique | 1,7 | 1,4 | 1,9 |
| Oléique | 4,2 | 6,5 | 3,0 |
| Linoléique | 5,6 | 17,4 | trace |
| Linolénique | 0,1 | trace | trace |
| Gadoléique | 0,5 | 0,7 | 0,5 |
| α -Éléostéarique | 72,5 | 41,8 | 87,8 |
| Éléostéarique (total) | 85,9 | 73,0 | 92,4 |

^a Déterminée par hydrolyse partielle catalysée par la lipase pancréatique de porc

Tableau 2. Composition et régio-distribution des AGs présents dans l'huile de tung (% molaire)

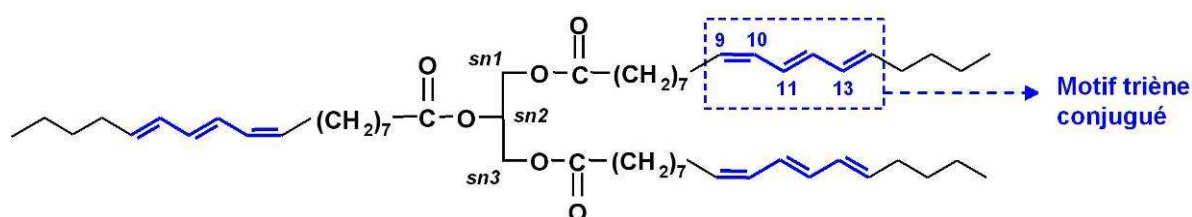


Fig. 35. Structure chimique de la triéléostéarine.

Enfin, tenant compte du fait que les huiles végétales contiennent des antioxydants endogènes comme les tocophérols, une quantification de ces composés a été réalisée par HPLC couplée à un détecteur fluorimétrique (λ_{ex} : 290/ λ_{em} : 330 nm) (**Fig. 36**). Par comparaison du profil chromatographique de l'huile avec des standards commerciaux, nous avons identifié la forme β comme étant majoritaire (230 $\mu\text{g/g}$).

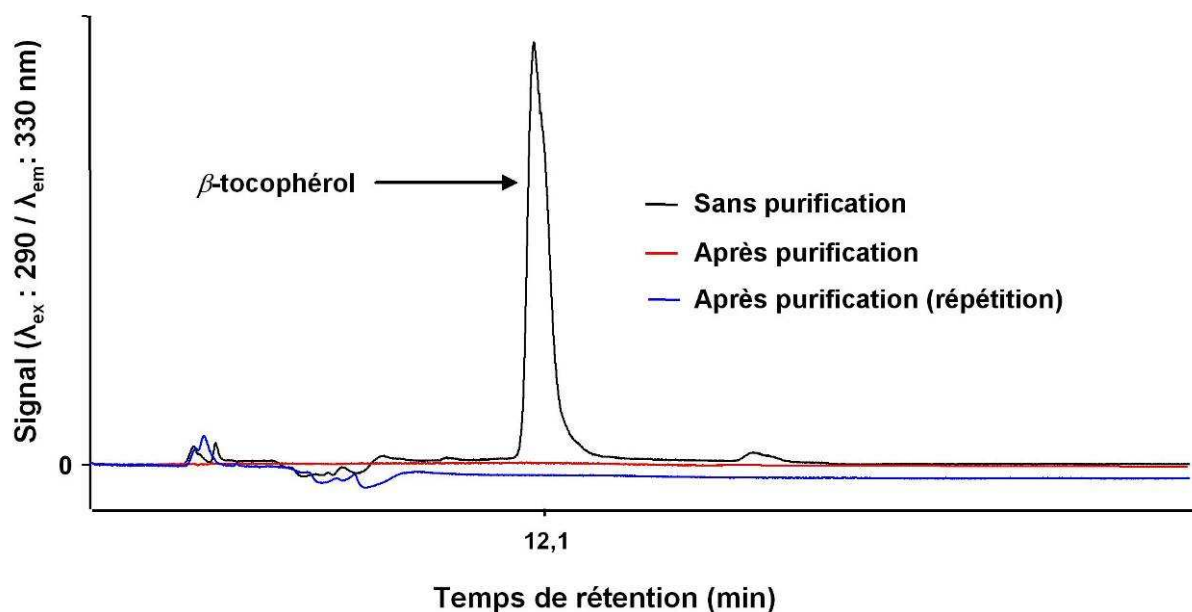


Fig. 36. Chromatogramme HPLC du profil en tocphérol de l'huile de tung avant et après purification sur colonne d'alumine.

Cependant, l'oxydation des tocphérols peut conduire à la formation de radicaux semi-quinones tocphéroxyles qui, à leur tour, peuvent être réduits par d'autres substances antioxydantes. Or, pour déterminer la stricte capacité antioxydante des composés phénoliques et non leur éventuel effet synergique avec les tocphérols, les expérimentations doivent être conduites en absence de ces derniers. Pour cela, l'huile de tung a été purifiée (obtention de TAGs purs) sur une colonne d'alumine afin d'éliminer le β -tocophérol, comme en témoigne la **Fig. 36**. Par ailleurs, l'analyse par HPLC de l'huile de tung avant et après purification n'a révélé aucune différence au niveau du profil des TAGs (données non présentées). Finalement, des essais avec les deux types d'huile (purifiée ou non) ont été réalisés afin de déterminer l'influence des tocphérols endogènes sur le comportement antioxydatif des substances testées.

1.1.4. Propriétés spectrales de l'huile de tung

Les TAGs de l'huile de tung contenant des triènes conjugués présentent une forte absorption dans le domaine ultraviolet avec saturation du seuil de détection spectrophotométrique (généralement à des valeurs de 3-4). Sa dilution dans un solvant, comme l'eau (dans le cas d'une émulsion) ou un solvant organique, est nécessaire pour observer son spectre d'absorption qui se manifeste sous la forme d'un pic trifide comportant trois maxima à 263, 273 et 283 nm (**Fig. 37a**). Si les propriétés d'absorption des acides éléostériques sont bien documentées dans la littérature scientifique ([Brauer et Steadman, 1943](#) ; [Holman *et al.*, 1945](#) ;

Solodovnik, 1967 ; Hopkins *et al.*, 1969 ; Pencrac'h *et al.*, 2002 ; Tsuzuki *et al.*, 2004), celles concernant ses propriétés de fluorescence sont en revanche plus rares. Sklar *et al.* (1975) reportent que l'acide α -éléostéarique exerce une fluorescence faible (λ_{em} : 345 nm) dont l'émission maximale est proche de celle du tryptophane (λ_{abs} : 357 nm). Morgan *et al.* (1980) ont, quant à eux, observé que la fonction triène conjugué (dérivé de l'oxydation de l'acide parinarique) n'émettait pas de fluorescence suite à une excitation à 275 nm. Cependant, puisque l'intensité de la fluorescence de systèmes conjugués peut être influencée par la nature de leur environnement chimique (Kuypers *et al.* 1987), nous avons étudié les propriétés de fluorescence de l'huile de tung en émulsion de type huile dans eau. Pour cela, l'établissement du spectre d'absorption d'une substance est un préalable à l'étude de son spectre de fluorescence. En effet, la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption est généralement proche de celle de l'excitation maximale en fluorescence. Un balayage des longueurs d'onde d'émission à partir d'une excitation à 273 nm a montré que la longueur d'onde d'émission maximale était d'environ 400 nm (Fig. 37b). Cette valeur de faible intensité n'est pas en accord avec celle donnée par Sklar *et al.* (1975), et présente, de plus, de fortes similitudes avec celle de l'acide *cis*-parinarique (λ_{em} : 410-413 nm). Par ailleurs, la fluorescence de l'huile de tung en émulsion étant située dans une gamme de longueurs d'onde généralement sujettes aux interférences, la fluorescence intrinsèque de deux modèles de microplaques noires (Corning et FluoTrac Greiner) a été mesurée (Fig. 37b).

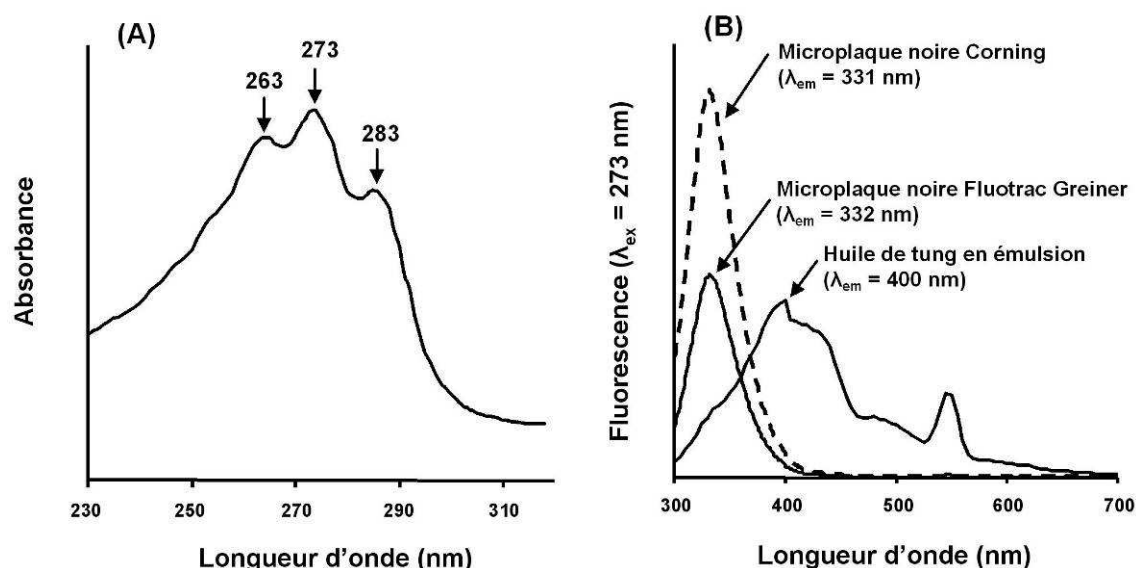


Fig. 37. Exemple de spectre d'absorption (A) et de fluorescence (B) (λ_{ex} : 273 nm) de l'huile de tung. Les spectres ont été obtenus (sans aucune correction de l'absorbance de la microplaque et du milieu) sur de l'huile de tung (115 μ M) émulsifiée avec 17 μ M de Brij 35 dans une solution de tampon phosphate (pH 7,2) à 37°C.

1.1.5. Préparation de l'émulsion

La première problématique pour émulsifier l'huile de tung concerne le mode d'incorporation de l'huile. Ainsi, [Pencrac'h et al. \(2002\)](#) ont préalablement dissous l'huile de tung dans l'éthanol avant de l'incorporer dans une solution aqueuse d'émulsifiant. D'après ces auteurs, la solution éthanolique d'huile de tung est stable en présence d'antioxydant (butylhydroxytoluène) durant un mois. Or, dans notre cas, l'évaluation des propriétés antioxydantes d'une substance donnée serait inéluctablement biaisée par la présence d'un quelconque antioxydant. Ainsi, comme attendu, la solution éthanolique d'huile de tung s'est oxydée rapidement en absence d'antioxydant, limitant ainsi l'intérêt de recourir à un tel mode d'incorporation. Tenant compte de ce problème d'instabilité, nous avons choisi de stocker l'huile de tung à -20°C sans procéder à une dissolution dans un solvant. Les émulsions ont, par la suite, été préparées extemporanément (2-3 min avant la mesure) en mélangeant l'huile dès sa sortie du congélateur à une solution aqueuse contenant l'émulsifiant.

Mesurer précisément l'étendue de l'oxydation en milieu émulsionné suppose un système stable, ce qui, dans notre cas, a nécessité l'emploi de tensio-actifs. Ainsi, en parallèle du mode d'incorporation de l'huile de tung, la nature physicochimique de la membrane tensio-active entourant la gouttelette d'huile est un paramètre crucial quant aux performances d'oxydation et d'antioxydation des différentes espèces chimiques. Parmi la multitude d'agents émulsifiants, citons plus particulièrement les protéines, les phospholipides, les mono- et diglycérides d'acides gras, les Spans, les Tweens, les éthers alkyliques de polyoxoéthylène de type Brij, ainsi que les sels biliaires. Or, suivant leur nature, certains écueils peuvent survenir. Ainsi, certaines protéines aux propriétés émulsifiantes contiennent des résidus cystéines susceptibles de s'oxyder¹⁴ ([McClements et Decker, 2000](#)). Un biais similaire peut être observé avec des phospholipides ou des mono- et diglycérides d'acides gras comportant des acides gras insaturés¹². En outre, [Nuchi et al. \(2001\)](#) ont observé que l'emploi d'émulsifiant de type Tween pouvait conduire à la formation d'hydroperoxydes. Ainsi, après élimination des émulsifiants susceptibles de biaiser les résultats, mais également par soucis de simplicité, nous avons sélectionné une famille d'émulsifiants non-ioniques : les éthers alkyliques de polyoxoéthylène de type Brij et de formule générale $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{OH}$. Ce type d'émulsifiant permet d'éviter tout effet potentiellement répulsif ou attractif, de la membrane, vis-à-vis d'antioxydants chargés électriquement. Or, dans les conditions de pH neutre (pH 7,2) de la méthode CAT, la fonction acide carboxylique des acides phénoliques ou

¹⁴ Ces biais peuvent néanmoins être considérés comme naturels et donc représentatifs.

du Trolox est majoritairement dissociée en sa base conjuguée (anion carboxylate). Le choix des éthers alkyls de polyoxyéthylène comme agents tensio-actifs repose également sur leur inertie vis-à-vis de l'oxydation¹⁵. Enfin, leur disponibilité commerciale associée au fait que ces émulsifiants n'exhibent aucune absorption ou fluorescence dans le spectre ultraviolet représentent autant de prérequis à leur utilisation.

Dans cette famille de composés, nous nous sommes plus particulièrement focalisé sur l'éther laurique de polyoxyéthylène(23), trivialement appelé Brij-35 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_{23}-\text{OH}$) qui est assurément le mieux documenté dans la littérature. De plus, il est admis qu'une balance hydrophile/lipophile (HLB) comprise entre 8 et 18 est nécessaire pour réaliser une émulsion de type huile dans eau. C'est précisément le cas du Brij-35 qui présente une HLB de 17 permettant de mettre en œuvre ce type d'émulsion contrairement à d'autres dérivés Brij. À titre d'exemple, le Brij-52 (éther cétylique de polyoxyéthylène(2)) présente une HLB de 5, laquelle est plus indiquée pour mettre en œuvre une émulsion de type eau dans huile.

Afin d'optimiser les conditions d'émulsification, la spectrophotométrie d'absorption semble être un outil plus adapté que la fluorimétrie. En effet, la très faible intensité de l'émission à 400 nm de l'huile de tung comparée à la forte absorption à 273 nm rend difficile l'évaluation des propriétés spectrales de l'huile de tung lorsque les conditions ne sont pas optimales et que les signaux d'absorption et d'émission sont faibles.

Ainsi, en utilisant la spectrophotométrie d'absorption, il est apparu que, lorsque l'huile de Tung était incorporée au PBS en absence de Brij 35, le spectre d'absorption entre 230 et 320 nm ne présentait pas le profil caractéristique attendu avec un λ_{max} à 273 nm. En revanche, le signal trifide a été restauré en ajoutant 17 μM de Brij 35 à la dispersion d'huile (**Fig. 38**). [Pencrac'h et al. \(2002\)](#) ont observé le même comportement spectral de l'huile de tung en présence (2 mM) ou en absence de taurodésoxycholate de sodium qui est un émulsifiant anionique. Nous avons d'autre part remarqué que la concentration de Brij 35 (pour une concentration en huile fixée à 115 μM) exerçait une influence sur l'intensité du signal trifide. Globalement, plus la concentration de Brij 35 augmente plus l'absorbance à 273 nm diminue jusqu'à une concentration seuil de Brij 35 (entre 170 μM et 1 mM) au delà de laquelle le signal trifide est invariant (**Fig. 38**) ; l'addition de quantités supérieures n'exerçant plus d'effet notable.

¹⁵ Notons que tous les membres de cette famille d'émulsifiants ne sont pas saturés. Ainsi, les Brij-93, -97, et -98 sont des éthers oléiques de polyoxyéthylène.

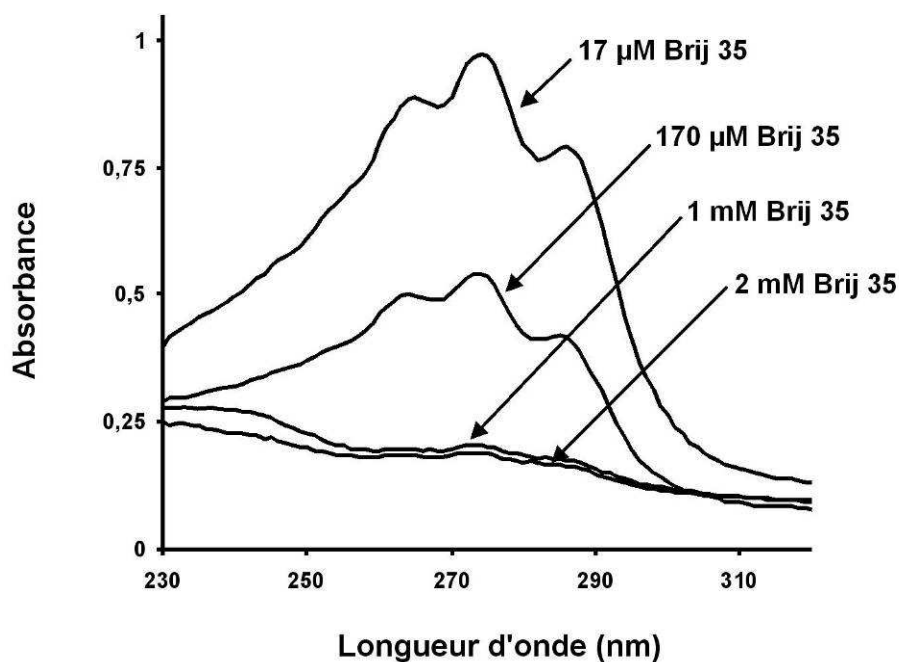


Fig. 38. Effet de la concentration de Brij-35 sur le spectre ultraviolet de l'huile de tung (115 μM) en émulsion dans une solution de tampon phosphate (pH 7,2) à 37°C. Aucune correction de l'absorbance de la microplaque et du milieu n'a été réalisée.

D'autre part, considérant le fait que l'émulsifiant en excès peut affecter la partition de l'antioxydant entre les phases aqueuse et huileuse, il est préférable de l'utiliser à sa concentration minimale requise (Decker *et al.*, 2005). En effet, au dessus d'une certaine concentration, connue sous le nom de concentration micellaire critique (CMC), l'émulsifiant non adsorbé à l'interface forme des micelles. Les micelles sont des agrégats de molécules amphiphiles dont la partie hydrophobe est orientée vers l'intérieur, tandis que la tête hydrophile forme l'extérieur (Dickinson et McClements, 1995). Or, les micelles d'émulsifiants sont capables d'incorporer des molécules apolaires au sein de leur cœur hydrophobe. Ainsi, suivant la polarité de l'antioxydant testé, un excès de Brij 35 peut conduire à un transport d'un antioxydant initialement situé à l'interface, vers la phase aqueuse. Il est à cet égard intéressant de constater que la concentration de Brij 35 de 17 μM se situe au dessous de la concentration micellaire critique (CMC) théorique (91 μM) de cet émulsifiant, tandis que les concentrations supérieures testées sont toutes situées au dessus de cette CMC théorique. C'est pourquoi, la plus faible concentration de Brij 35 (17 μM) a finalement été sélectionnée pour les essais ultérieurs.

Concernant l'homogénéisation, il est apparu que l'absorbance à 273 nm d'une émulsion de 115 μM d'huile de tung purifiée augmentait proportionnellement avec la durée de cisaillement à l'Ultra Turrax, puis se stabilisait. Prenant en compte cette évolution, les conditions

d'homogénéisation ont été fixées à ~ 2400 rpm pour 90 sec, ce qui est suffisant pour obtenir une absorbance supérieure à 0,7 ; valeur seuil en dessous de laquelle l'allure des courbes et la répétabilité des résultats sont altérées. À cet égard, il s'est avéré de manière surprenante, que l'opération cruciale pour obtenir un signal trifide satisfaisant consistait en une agitation grossière (10 sec) avec un agitateur classique de type vortex avant l'étape d'homogénéisation à l'Ultra Turrax mentionnée plus haut. Cette agitation est supposée permettre le fractionnement des gouttelettes, ce qui pourrait maximiser l'étape ultérieure d'homogénéisation à l'Ultra Turrax. Notons que le spectre ultraviolet de l'émulsion obtenu sans agitation au vortex, ressemble à celui observé lorsqu'un excès de Brij 35 (1-2 mM) a été employé pour émulsifier l'huile (**Fig. 38**).

Enfin, en termes de stabilité, une décroissance lente et linéaire (sur 5 h) d'absorbance à 273 nm avec le temps a été observée en absence de tout inducteur artificiel d'oxydation. Ce phénomène a clairement été attribué à une oxydation plutôt qu'à une éventuelle déstabilisation de l'émulsion, comme en témoigne l'augmentation concomitante de l'absorbance à 234 nm, correspondant à la formation des diènes conjugués. Nous postulons que cette oxydation de l'huile de tung en absence d'inducteur artificiel d'oxydation est essentiellement due à l'étape d'homogénéisation à l'Ultra Turrax (2400 rpm, 90 sec) conduisant à l'incorporation d'une grande quantité d'air par foisonnement. Ceci pourrait sembler problématique en termes quantitatifs, cependant quel que soit l'antioxydant testé, ce biais affecte les données de la même manière, ce qui finalement n'induit pas d'erreur. D'autre part, nous avons tenté de transformer cet inconvénient en avantage, en utilisant ce procédé d'homogénéisation pour induire une oxydation naturelle. Bien que l'oxydation naturelle de triènes conjugués soit plus rapide que celle de triènes non conjugués, l'oxydation de l'huile de tung purifiée a atteint un état stationnaire après ~ 15 h de réaction. Or, l'évaporation du milieu réactionnel, négligeable en oxydation artificiellement induite comme dans le cas du test ORAC_{FL}, devient un paramètre limitant en oxydation naturelle pour laquelle les durées sont plus longues. De surcroît, il est apparu que l'évaporation n'était pas identique d'un puits à l'autre, celle-ci étant plus intense à la périphérie de la microplaque. Ainsi, un gradient de température, inhérent au système de chauffe, s'établit dans la microplaque, ce qui peut biaiser les résultats de manière considérable. À l'avenir, différentes solutions pourront être mises en œuvre, notamment l'utilisation d'un film plastique adhésif transparent dans le domaine ultraviolet pour couvrir la microplaque, ou encore le garnissage de l'extérieur des puits avec un isolant thermique comme le glycérol par exemple. D'autre part, comme nous le verrons ci-après, la présence de points isobestiques dans le spectre de l'huile de tung lors de son

oxydation pourrait offrir une seconde opportunité de corriger l'évaporation. Malgré ces corrections potentielles, nous avons envisagé de contourner le problème de l'évaporation en accélérant artificiellement l'oxydation de l'huile de tung.

1.1.6. Oxydation artificielle de l'huile de tung en émulsion

Si le mode d'induction de l'oxydation est un élément crucial dans le développement d'une procédure *in vitro* fiable, l'analyste ne dispose malheureusement d'aucun inducteur artificiel capable de mimer un processus oxydatif naturel. Ceci est dû au fait que l'oxydation naturelle emprunte de multiples voies réactionnelles comme par exemple l'oxydation enzymatique médiée par les lipoxgénases, la photo-oxydation impliquant l'oxygène singulet, l'autoxydation par l'oxygène moléculaire ou la dégradation des hydroperoxydes par des métaux de transition. Dans ce contexte, la recherche d'inducteurs artificiels d'oxydation (azo-initiateur, métal de transition, ...) qui tiennent compte de ce phénomène multidimensionnel de manière exhaustive est illusoire. Tenant compte de ces limites, nous avons sélectionné parmi les différents inducteurs d'oxydation, l'initiateur azo hydrophile 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochlorhydrique (AAPH) (**Fig. 39**).

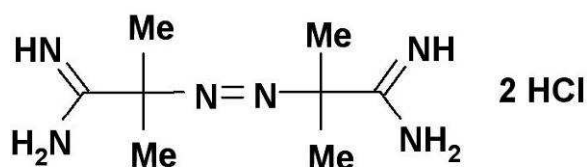


Fig. 39. Structure chimique du 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochlorhydrique (AAPH).

Ainsi, malgré son caractère artificiel, cet initiateur azo est facile d'emploi et génère par décomposition spontanée à 37°C des radicaux libres R[•] centrés sur le carbone (**réaction 37**).



En milieu aérobie, les radicaux libres R[•] réagissent immédiatement avec l'oxygène triplet (**réaction 38**) pour former des peroxyradicaux ROO[•] centrés sur l'oxygène (peroxyradicaux *initiateurs*),



lesquels vont ensuite se stabiliser en arrachant un atome hydrogène à un acide gras polyinsaturé de l'huile de tung (**réaction 39**). Cette réaction va générer un radical libre L^\bullet centré sur le carbone et dérivé du lipide.



L^\bullet va réagir avec l'oxygène triplet pour donner naissance à un peroxyradical lipidique LOO^\bullet (peroxyradical lipidique *propagateur*) (**réaction 40**),



lequel va en retour propager le processus oxydatif (**réaction 41**).



Comme il a pu être observé en spectrophotométrie d'absorption, l'addition d'AAPH engendre une diminution graduelle de l'absorbance à 273 nm de manière dose-dépendante (données non présentées). La concentration d'AAPH a été fixée à 1 mM, ce qui correspond à un compromis satisfaisant entre le temps d'analyse et le ratio molaire substrat oxydable/initiateur azo. Cependant, il est à noter qu'une diminution drastique de la durée d'analyse peut être obtenue lorsque l'on se place dans les mêmes conditions de concentrations en AAPH que celles utilisées dans la méthodologie ORAC (13 mM). Dans notre cas, l'oxydation induite par 1 mM d'AAPH, d'une dispersion d'huile de tung purifiée (115 μ M) dans l'eau et émulsifiée par 17 μ M de Brij 35 a été suivie par spectrophotométrie UV entre 230 et 320 nm durant 5 h (**Fig. 40**).

Il est apparu que la chute d'absorbance à 273 nm s'accompagnait d'une augmentation de l'absorbance dans la région de 234 nm. Ce résultat, précédemment reporté par [Brauer et Steadman \(1944\)](#) ainsi que [Holman et al. \(1945\)](#), peut être attribué à la dégradation oxydative du triène conjugué en diènes conjugués. De ce fait, la mesure de l'apparition des diènes conjugués pourrait sembler de prime abord équivalente à la mesure de la disparition du triène conjugué. Or, comme on peut l'observer sur la **Fig. 40**, la chute d'absorbance à 273 nm est trois fois plus importante que l'augmentation de l'absorbance à 234 nm. Cette dernière se situe, en outre, dans un domaine spectral beaucoup moins accessible, la majorité des microplaques en matières plastiques adaptées à la mesure dans le domaine ultraviolet ayant un seuil de transmittance à 230 nm. De ce fait, la formation des diènes conjugués apparaît sous la forme d'un épaulement, ce qui limite la précision de sa mesure. Enfin, comme nous l'avons

préalablement abordé, les diènes conjugués sont des intermédiaires réactionnels qui peuvent évoluer vers des stades d'oxydation plus avancés. Il semble donc plus avantageux de mesurer la dégradation irréversible d'un système conjugué plutôt qu'une accumulation temporaire de l'un des produits d'oxydation.

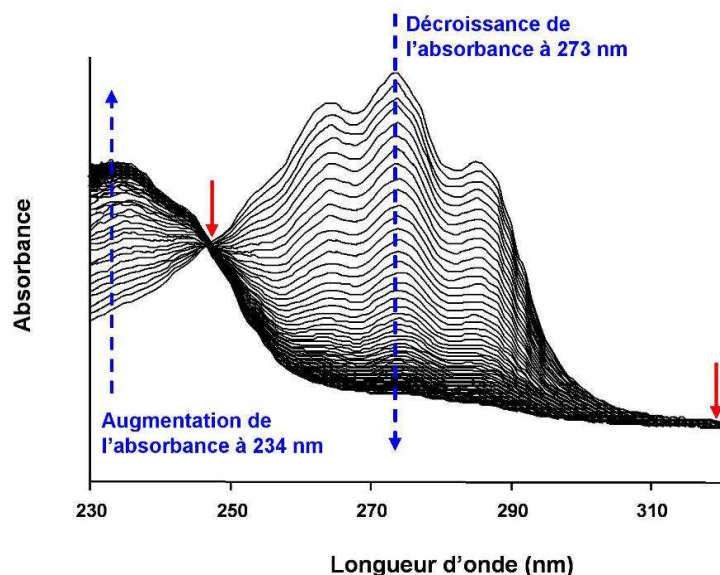


Fig. 40. Évolution du spectre UV de 115 μ M d'huile de tung émulsifiée dans le PBS (pH 7,2) par 17 μ M de Brij 35 lors de l'oxydation accélérée induite par 1 mM d'AAPH à 37°C. Les flèches rouges représentent les points isobestiques. Aucune correction de l'absorbance de la microplaque ou du milieu n'a été réalisée.

Afin de vérifier que les autres acides gras insaturés présents en quantité notable (acides oléique et linoléique, **Tableau 2**) n'induisaient pas d'absorption parasite, le suivi spectrophotométrique de l'oxydation d'émulsion de trioléine et de trilinoléine a été réalisé dans les mêmes conditions. Comme le montre la **Fig. 41**, aucune évolution notable de l'absorbance à 273 nm n'a pu être observée, signifiant ainsi que les produits d'oxydation de ces TAGs n'interféraient pas dans la fenêtre spectrale des triènes conjugués. Ainsi, parmi les acides gras susceptibles de s'oxyder et présents en quantité notable, seuls les acides éléostériques contribueraient au signal à 273 nm.

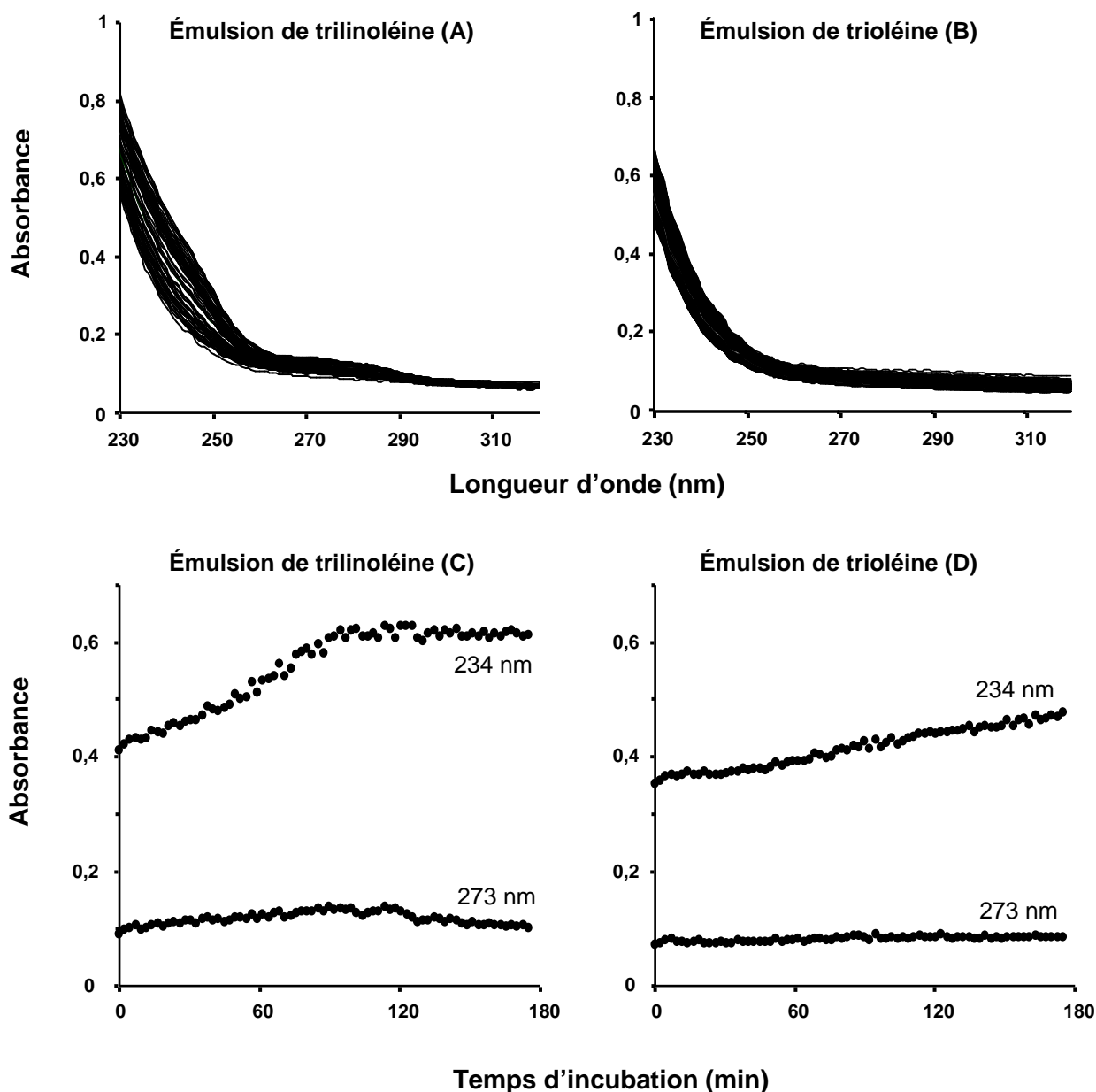


Fig. 41. Évolution du spectre UV de 115 μM de trilinoléine (a) ou de trioléine (b) émulsifiées dans le PBS (pH 7,2) par 17 μM de Brij 35 lors de l'oxydation accélérée induite par 1 mM d'AAPH à 37°C. Aucune correction de l'absorbance de la microplaque et du milieu n'a été réalisée.

Les **Figs. 40** et **41** montrent d'autre part que l'oxydation complète de l'huile de tung, tout comme l'oxydation de la trioléine et de la trilinoléine, ne permet pas d'atteindre une valeur d'absorbance nulle. Cette absorbance résiduelle provient probablement de la diffraction de la lumière sur les gouttelettes d'huile émulsifiée. En effet, un milieu émulsifié n'est pas totalement transparent aux photons. Pour s'affranchir de cette absorbance résiduelle, la soustraction du spectre de l'huile de tung par un témoin contenant le même milieu réactionnel, à l'exception de l'huile, pourrait être envisagée. Cependant, l'analyse de substances

antioxydantes susceptibles d'absorber, même faiblement, à ces longueurs d'onde, nécessiterait l'emploi d'un témoin par échantillon. Cependant, puisque cette absorbance résiduelle est la même pour tous les échantillons testés, celle-ci ne semble pas induire en erreur. De ce fait, nous n'avons pas eu recours à un tel témoin qui aurait divisé de moitié le débit de la méthode.

En complément de l'étude par spectrophotométrie d'absorption, l'oxydation de l'huile de tung a été examinée par spectrofluorimétrie, toute chose étant égale par ailleurs. Ainsi, le suivi fluorimétrique (λ_{ex} : 273 nm) de l'oxydation d'une émulsion d'huile de tung a montré une légère décroissance de l'émission à 400 nm accompagnée d'une augmentation beaucoup plus importante de l'émission à 335 nm (**Fig. 42**). Ce phénomène est difficile à interpréter, notamment du fait que cette dernière émission peut avoir de multiples causes. En effet, comme nous l'avons préalablement montré, la fluorescence propre à la microplaque (Fluotrac Greiner, $\lambda_{\text{em}} = 332$ nm) pourrait expliquer la longueur d'onde d'émission à 335 nm, mais semble, en revanche, incapable de rendre compte de son accroissement drastique. Cette apparition de fluorescence, par son allure, suggère plutôt la formation de produits d'oxydation. Cependant, si la formation d'adduits fluorescents (λ_{ex} : 340-390/ λ_{em} : 430-490 nm) entre les groupements amines libres et les aldéhydes réactifs est bien documentée, peu de données relatives à des produits fluoresçant à 335 nm sont disponibles. Plusieurs hypothèses peuvent tout de même être formulées, la première étant que l'huile de tung oxydée génère des fluorophores.

En marge des produits d'oxydation de l'huile de tung, une telle fluorescence suggère également l'implication des tocophérols. En effet, ces antioxydants endogènes préalablement identifiés comme étant de la forme β , fluorescent à 330 nm suite à une excitation à 290 nm (Taylor, 1976). Or, dans le cas d'une oxydation de l'huile de tung, une consommation des tocophérols suppose une extinction de fluorescence et non son apparition, ce qui infirme l'implication directe des tocophérols. D'autre part, d'après Taylor (1976), le principal produit d'oxydation des tocophérols, le tocophérylquinone, est un composé non fluorescent. Bien évidemment l'implication des tocophérols pourrait être aisément confrontée à l'expérience, en éliminant les tocophérols de l'huile de tung, par purification des TAGs sur une colonne d'alumine. Cependant, dans tous les cas, la mesure de produits d'oxydation ne renseigne que temporairement sur l'oxydation puisque ces produits peuvent se transformer en d'autres produits qui ne seront pas forcément détectables. Ainsi, bien que la fluorimétrie constitue une méthode plus spécifique que la spectrophotométrie d'absorption, cette dernière semble être la seule, dans ce système de test, à fournir une information sur la disparition du triène conjugué.

Pour cette raison, nous avons sélectionné la spectrophotométrie d'absorption pour évaluer l'étendue de l'oxydation de l'huile de tung en absence ou en présence de différentes concentrations de composés potentiellement antioxydants.

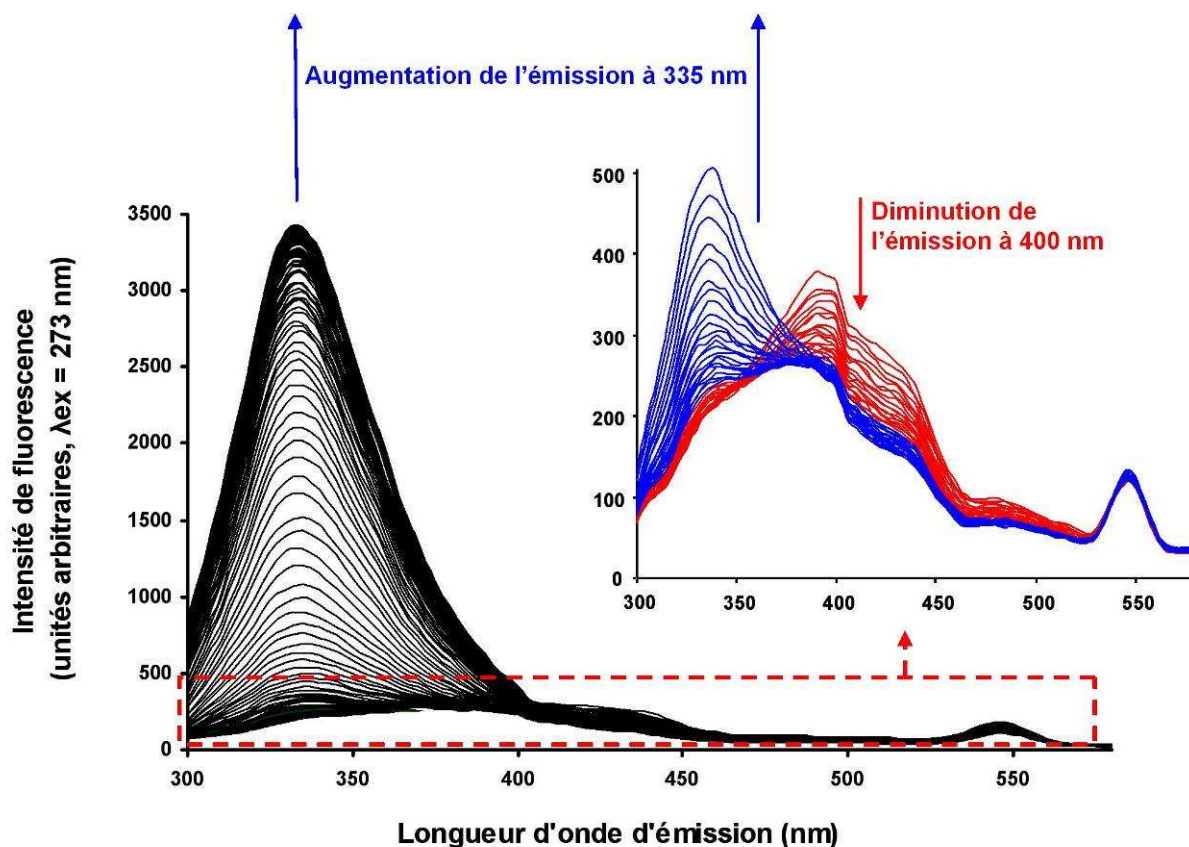


Fig. 42. Évolution du spectre d'émission d'huile de tung émulsionnée dans le PBS (pH 7,2) par 17 μ M de Brij 35 lors de l'oxydation accélérée induite par 1 mM d'AAPH à 37°C. Aucune correction de l'absorbance de la microplaque ou du milieu n'a été réalisée.

1.2. MESURE DE LA CAPACITÉ ANTIOXYDANTE DE COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

Globalement, la validation du test CAT a consisté à vérifier si l'addition de composés antioxydants pouvait induire un retard d'oxydation de l'huile de tung mesurable par spectrophotométrie à 273 nm. Dans cette optique, différentes concentrations d'antioxydants modèles ont été utilisées, en l'occurrence, les acides gallique, 5-caféoylquinique et rosmarinique ainsi que l'épicatéchine. Malgré son caractère artificiel, le Trolox (analogue hydrosoluble de l' α -tocophérol, **Fig. 10**) a été choisi comme antioxydant de référence en raison de son large emploi dans les méthodologies existantes (ABTS, ORAC_{FL} et BODIPY), facilitant ainsi la comparaison de résultats obtenus par différents tests.

Se pose en premier lieu, la question du mode d'incorporation des substances antioxydantes à tester. En effet, les solutions aqueuses de composés phénoliques présentent le double inconvénient d'être très instables (Zhu *et al.*, 2000) et de limiter l'analyse aux substances hydrosolubles, ce qui réduit drastiquement la portée de la méthode. Pour y remédier, l'incorporation de l'antioxydant a été effectuée sous forme de solution dans le méthanol, ce dernier ayant l'avantage de solubiliser des molécules de polarité très différentes. En outre, les composés phénoliques en solution méthanolique sont bien plus stables qu'en solution aqueuse (tampon phosphate), ce qui permet une conservation de plusieurs heures à plusieurs jours à -20°C.

1.2.1. Aspects cinétiques

Dans un premier temps, il a été constaté que l'oxydation de l'huile de tung purifiée (TAGs purs) était plus rapide que celle de l'huile non purifiée (Fig. 43 a et b, courbes correspondantes à l'absence de Trolox). Ce comportement a été attribué à la présence de tocophérols endogènes dans l'huile non purifiée (230 µg/g). Par comparaison du profil chromatographique (HPLC) des tocophérols de l'huile avec des standards commerciaux, nous avons identifié la forme β comme étant majoritaire (Fig. 36). En termes de mécanisme d'action, ces derniers agissent vraisemblablement en tant que briseurs de chaîne de la peroxydation lipidique en induisant une phase de latence très faible, mais discernable.

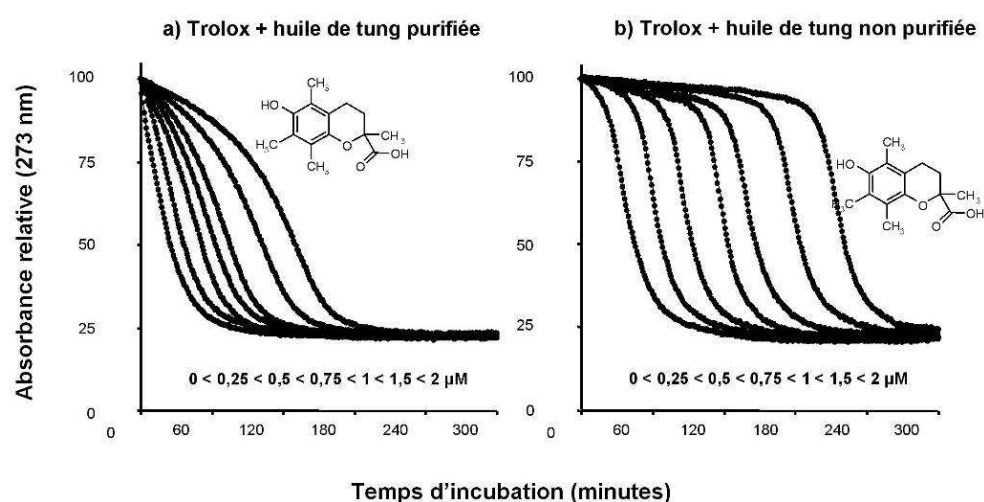


Fig. 43. Cinétiques de chute d'absorbance à 273 nm en absence ou en présence de différentes concentrations de Trolox en émulsion d'huile de tung purifiée (a) ou non (b). Le milieu réactionnel final contient 115 µM d'huile de tung, 17 µM de Brij 35, 1 mM d'AAPH et 0,25 à 2 µM de Trolox, dans le PBS (pH 7,2) à 37°C. Aucune correction de l'absorbance de la microplaque ou du milieu n'a été réalisée.

D'un point de vue thermodynamique, le radical semi-quinone tocophéroxyl peut être régénéré par des espèces réductrices ou antioxydantes, comme l'ascorbate ou les composés phénoliques. Or, cette régénération potentielle peut conduire à des effets non-additifs surtout dans les milieux hétérogènes de type émulsion, ce qui peut rendre difficile l'évaluation de la contribution de l'antioxydant. Ainsi, comme nous l'avons préalablement abordé, dans le but de mesurer la capacité antioxydante réelle des substances testées, les tocophérols doivent être éliminés de l'huile de tung afin d'éviter tout effet potentiellement synergique ou antagoniste. Dans la partie suivante, des expériences ont tout de même été réalisées avec de l'huile purifiée et non purifiée, afin de déterminer l'influence des tocophérols sur le comportement antioxydatif des substances testées.

Dans un deuxième temps, la **Fig. 43** montre que le Trolox retarde l'oxydation de l'huile de tung (qu'elle soit purifiée ou non) de manière dose-dépendante. Cependant, d'un point de vue cinétique, la présence ou l'absence de tocophérol modifie grandement le comportement antioxydatif. En effet, en présence d'huile de tung purifiée (**Fig. 43a**), le Trolox retarde l'oxydation sans induire de phase de latence distincte, et semble donc se comporter comme un antioxydant retardeur plutôt qu'un pur briseur de chaîne. En revanche, en présence d'huile de tung non purifiée (**Fig. 43b**), le Trolox supprime momentanément l'oxydation et induit une phase de latence, qui est hautement caractéristique d'un comportement antioxydatif de type briseur de chaîne (Goupy *et al.*, 2007). Une fois cette phase de latence disparue, la propagation radicalaire en chaîne de l'oxydation de l'huile de tung (médiée par les radicaux lipoperoxydes LOO^\bullet) se produit avec la même vitesse que durant l'oxydation non-inhibée par un antioxydant. D'autre part, il est également apparu qu'aucun autre antioxydant (épicatéchine et acides gallique, 5-caféoylquinique et rosmarinique) associé à l'huile de tung purifiée (**Fig. 44**) n'induisait de phase de latence significative, signant l'existence, de manière analogue au Trolox, d'un comportement de type retardeur plutôt que briseur de chaîne. En d'autres termes, aucun des antioxydants testés ne semble capable de réduire directement les radicaux lipoperoxydes propagateurs dérivés de l'huile de tung (LOO^\bullet , **réactions 40 et 41**), mais semble uniquement capable de piéger les radicaux peroxydes *initiateurs* dérivés de l'AAPH (ROO^\bullet , **réactions 38 et 39**).

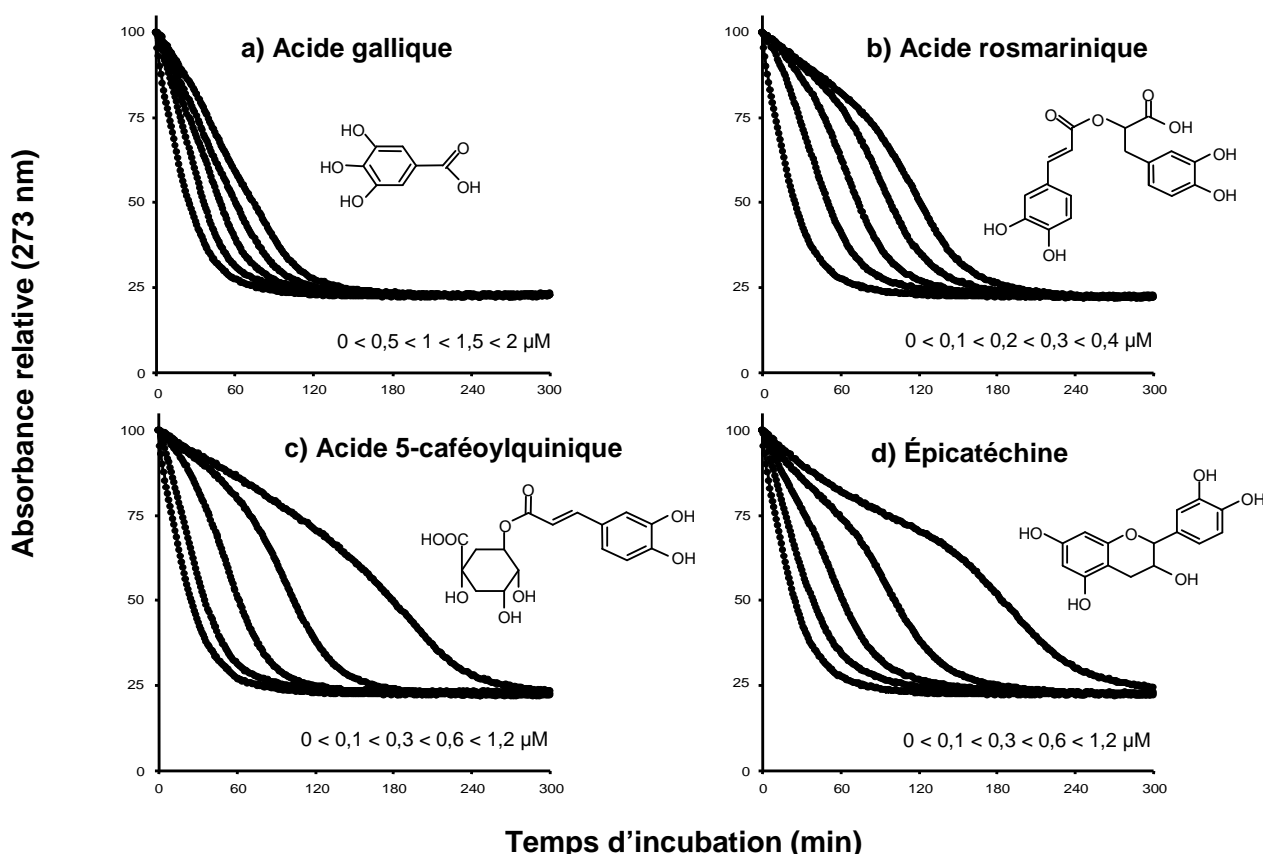


Fig. 44. Cinétiques de chute d'absorbance à 273 nm en absence ou en présence de différentes concentrations d'antioxydants. Le milieu réactionnel final contient 115 μM d'huile de tung purifiée, 17 μM de Brij 35, 1 mM d'AAPH et 0,5 à 2 μM d'acide gallique (a), 0,1 à 0,4 μM d'acide rosmarinique (b), 0,1 à 1,2 μM d'acide 5-caféoylquinique (c) et 0,1 à 1,2 μM d'épicatéchine (d), dans le PBS (pH 7,2) à 37°C. Aucune correction de l'absorbance de la microplaque et du milieu n'a été réalisée.

En première approche, ce résultat est à mettre en relation avec la polarité des molécules testées qui sont toutes hydrosolubles à pH neutre (7,2), ce qui défavorise un rapprochement entre ces antioxydants et les gouttelettes d'huile. En revanche, avec l'huile de tung non purifiée contenant des tocophérols endogènes, tous les antioxydants ont exercé une phase de latence significative de manière dose-dépendante (**Fig. 45**, données présentées pour l'acide gallique et l'épicatéchine) comme précédemment observé pour le Trolox.

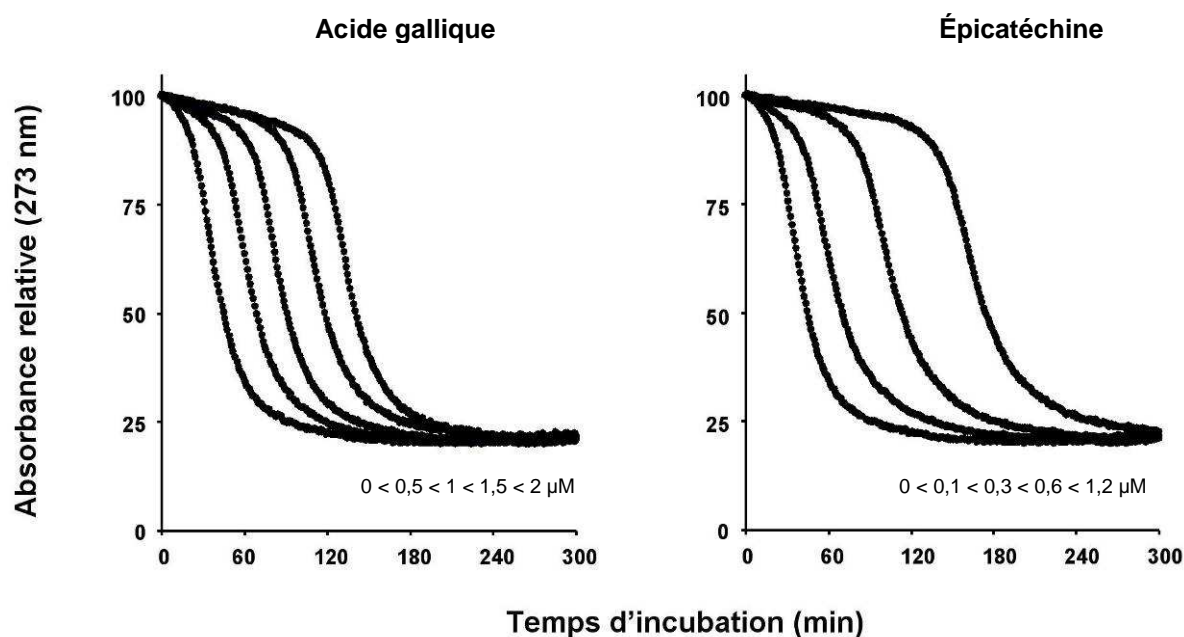


Fig. 45. Cinétiques de chute d'absorbance à 273 nm en absence ou en présence de différentes concentrations d'antioxydants. Le milieu réactionnel final contient 115 μM d'huile de tung non purifiée, 17 μM de Brij 35, 1 mM d'AAPH et 0,5 à 2 μM d'acide gallique (a) et 0,1 à 1,2 μM d'épicatéchine (b), dans le PBS (pH 7,2) à 37°C. Aucune correction de l'absorbance de la microplaque et du milieu n'a été réalisée.

Ce résultat suggère que le Trolox, l'acide gallique, l'épicatéchine et les acides chlorogénique et rosmarinique agissent en tant que retardeurs lorsqu'ils sont seuls, mais interagissent avec les tocophérols endogènes en présence d'huile de tung non purifiée. Ainsi, lorsque les tocophérols piègent les radicaux lipoperoxydes propagateurs, ils sont oxydés en radicaux semi-quinones tocophéroxydes, lesquels peuvent se stabiliser par quatre voies réactionnelles. La première consiste en une dimérisation homologue entre deux radicaux semi-quinones conduisant à la formation de produits d'oxydation très lipophiles comme les spirodiénones (Patil et Cornwell, 1978). La seconde procède d'une réaction rapide avec l'oxygène triplet pour former un hydroperoxyde de nature quinonique qui peut ensuite évoluer vers des stades plus avancés. Enfin, les deux dernières voies de stabilisation impliqueraient une compétition pour la capture, par le radical semi-quinone, d'un atome hydrogène soit à l'huile de tung soit à une substance antioxydante. La localisation, mais également la réactivité de ces derniers vis-à-vis du radical semi-quinone tocophéroxyde sont des paramètres qui peuvent orienter la réaction dans un sens ou dans l'autre. Concernant la réactivité, il est à noter que l'énergie de dissociation homolytique (BDE) globale des groupements O-H des composés phénoliques testés est beaucoup plus faible que celle des groupements C-H de l'huile de tung. Ainsi, en

théorie et en négligeant les effets liés à la localisation, la présence d'un antioxydant pourrait conduire à une régénération préférentielle des tocophérols. Cette hypothèse est fortement suggérée par l'allongement de la phase de latence en présence de quantités croissantes d'autres substances antioxydantes. Sur ce plan, les antioxydants hydrosolubles, comme les acides phénoliques et les flavonoïdes, pourraient réduire les tocophérols oxydés, à l'interface huile-eau, pour régénérer les tocophérols initiaux. Ces derniers pourraient à nouveau se comporter comme des antioxydants briseurs de chaîne positionnés à la membrane tensio-active (voire dans la gouttelette d'huile) où la peroxydation en chaîne a lieu. De plus amples investigations seront cependant nécessaires pour déterminer si ce mécanisme régénératif conduit à un effet additif, synergique ou antagoniste.

Enfin, en se focalisant plus particulièrement sur le cas de l'épicatéchine en présence d'huile de tung purifiée (**Fig. 44d**), il est intéressant de noter la singularité de sa cinétique d'antioxydation. En effet, après une décroissance relativement rapide au cours de laquelle la forme non oxydée de l'épicatéchine est censée piéger les radicaux ROO^\bullet dérivant de l'AAPH, il se produit un ralentissement (~ 60 min) jusqu'à un point d'inflexion (~ 140 min), suivi d'une reprise de la vitesse de peroxydation proche de la vitesse initiale. La première explication à formuler pourrait être que la réaction d'antioxydation de l'huile est contrôlée par la diffusion de l'antioxydant vers les centres réactionnels ; diffusion qui, dans le cas de l'épicatéchine, nécessiterait 60 min. Cependant, cette hypothèse est peu probable puisque les antioxydants et l'émulsion d'huile de tung sont pré-incubés sous agitation à 37°C avant analyse. Ce comportement cinétique d'antioxydation semble plutôt caractéristique d'une réaction composite, impliquant différentes espèces antioxydantes. En considérant la pente des différentes portions linéaires de la courbe, il est, en fait, probable que le(s) produit(s) d'oxydation de l'épicatéchine visualisé(s) sur la courbe entre 60 et 140 min protège(nt) mieux l'huile de tung de l'oxydation que l'épicatéchine elle-même.

1.2.2. Expression des résultats

D'un point de vue quantitatif, la manière d'extraire une information pertinente à partir des données analytiques est cruciale. Pour cela, plusieurs possibilités existent, incluant notamment les mesures de l'aire sous la courbe (AUC) ([Cao et al., 1993](#)), du temps d'inhibition, de la vitesse initiale de la réaction d'oxydation de l'huile de tung et enfin de la concentration en antioxydant nécessaire pour atteindre une inhibition de l'oxydation de 50 % (IC_{50}). Parmi elles, le calcul de l'AUC apparaît comme le seul traitement fournissant une information

globale indépendamment du mécanisme d'antioxydation. Par conséquent, le calcul de l'AUC permet la comparaison de l'efficacité d'antioxydants se comportant différemment, notamment au niveau de l'induction de la phase de latence dans le cas des briseurs de chaîne et des retardeurs. En outre, lorsque des précisions mécanistiques ou cinétiques sont nécessaires, des paramètres plus spécifiques comme la durée de la phase de latence ou la vitesse initiale peuvent également être pris en compte.

L'utilisation du calcul de l'AUC à partir des données présentées sur les **Figs. 43a** et **44** a permis d'obtenir des relations linéaires satisfaisantes ($R^2 \geq 0,997$) entre l'AUC nette (AUC Échantillon - AUC Blanc) et la concentration molaire en antioxydant pour les quatre molécules testées précédemment (**Fig. 46**), ce qui est un prérequis pour calculer leur valeur CAT (conjugated autoxidizable triene). En appliquant l'équation 4, l'acide rosmarinique présente la plus forte valeur CAT ($4,57 \pm 0,77$ équivalent Trolox (ET)) tandis que l'acide gallique présente la plus faible ($0,43 \pm 0,05$ ET) ; celles de l'épicatéchine ($2,38 \pm 0,03$ ET) et de l'acide 5-caféoylquinique ($2,39 \pm 0,14$ ET) étant intermédiaires.

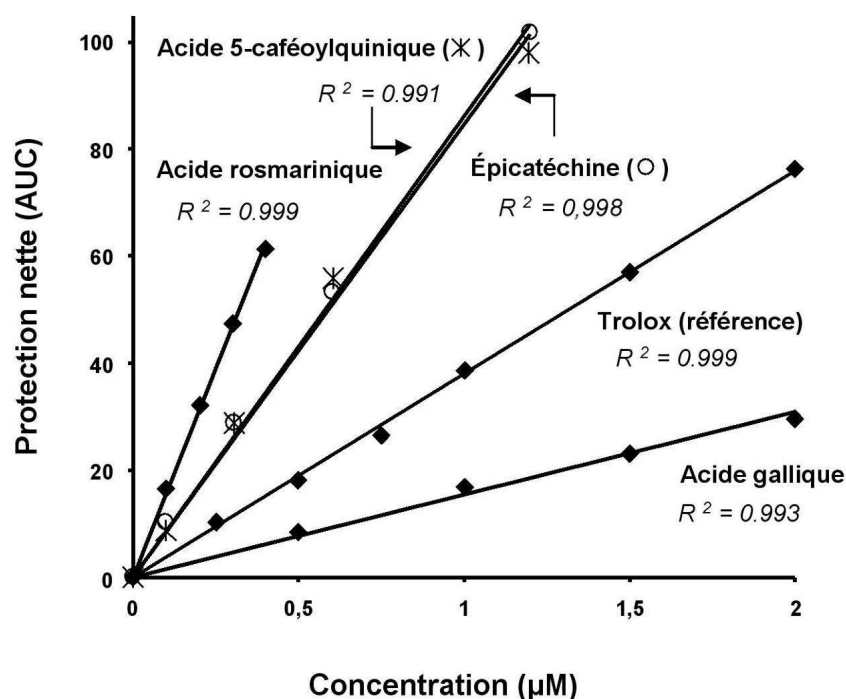


Fig. 46. Aire sous la courbe ou protection nette AUC (AUC Échantillon - AUC Blanc) vs. concentrations pour cinq antioxydants différents. Les valeurs reportées sont exprimées comme la moyenne de trois expérimentations indépendantes réalisées sur six mois, avec trois lots commerciaux différents d'huile de tung, cette dernière étant purifiée.

L'étude de la relation existant entre la structure moléculaire et la capacité antioxydante de ces composés sera spécifiquement traitée dans le chapitre suivant.

1.3. CONCLUSION

En conclusion, les acides gras polyinsaturés (AGPI) contenant des triènes conjugués présentent une susceptibilité oxydative exacerbée associée à des propriétés d'absorption intéressantes dans le domaine ultraviolet. Parmi toutes les huiles végétales contenant ces AGPIs particuliers, comme les acides jacarique, calendique, catalpique, punique ou éléostéarique, les TAGs issus de l'huile de tung commercialement disponible renferment une grande quantité de ces derniers (86 %), constituant par conséquent un substrat oxydable sensible, bon marché et pertinent. En effet, en tenant compte du fait que les TAGs sont majoritairement rencontrés (à côté des phospholipides) dans les milieux alimentaires et biologiques, ils représentent de ce fait, l'une des cibles les plus représentatives pour évaluer l'activité antioxydante de molécules ou d'extraits végétaux. En outre, la méthode CAT emploie un mode de détection spectrophotométrique couramment employé dans les laboratoires, et présente également l'avantage de pouvoir être réalisée sur un spectrophotomètre classique à cuve ou sur lecteur de microplaques pour une application haut-débit.

D'autre part, selon [Halliwell \(1990\)](#), il est délicat de distinguer si un antioxydant agit par piégeage direct des peroxyradicaux dérivés de l'AAPH, ou par piégeage de radicaux lipoperoxydes dérivés du substrat lipidique, ce qui semble plus représentatif des mécanismes physiologiques. Dans notre test, il est possible de distinguer ces comportements à partir de l'allure des cinétiques d'oxydation de l'huile de tung, ce qui fournit une information pertinente sur le mécanisme antioxydatif (retardeur vs. briseur de chaîne). En outre, dans certains cas, l'allure des courbes semble pouvoir renseigner sur la contribution des produits d'oxydation dérivés de l'antioxydant, comme le cas de l'épicatéchine le suggère.

Finalement, l'utilisation d'antioxydant 100 fois moins concentré que l'huile de tung est en accord avec la définition classique d'un antioxydant, et dans un deuxième temps, implique une compétition entre l'antioxydant et le substrat oxydable pour réduire les radicaux libres. Ce test semble donc particulièrement bien adapté à l'évaluation des antioxydants dans le contexte spécifique de l'oxydation des lipides. Il pourrait ainsi constituer à l'avenir, un complément analytique aux autres méthodes couramment employées et, par conséquent, s'inscrire dans une approche résolument multidimensionnelle de l'étude des phénomènes oxydatifs et antioxydatifs.

2. Étude de la relation structure-activité de composés phénoliques simples

2. ÉTUDE DE LA RELATION STRUCTURE-ACTIVITÉ DE COMPOSÉS PHÉNOLIQUES SIMPLES

Au cours de l'évolution, les organismes aérobies dont l'Homme, se sont adaptés pour contrer les effets délétères du stress oxydant, notamment par la mise en place de systèmes de défense antioxydante. En marge de ces défenses endogènes, nombre d'études s'accordent aujourd'hui sur l'importance de la contribution des antioxydants exogènes, apportés par l'alimentation, dans la lutte contre le stress oxydant. Parmi eux, les composés phénoliques semblent particulièrement prometteurs en raison de leur ubiquité dans le règne végétal, mais également de leurs fortes propriétés antioxydantes. Or, une meilleure maîtrise de leur potentiel suppose de connaître les déterminants physico-chimiques de la capacité antioxydante. Pour répondre à cette question, de nombreux auteurs ont étudié la relation existant entre la structure moléculaire et la capacité antioxydante de ce type de molécules. Pour cela différentes méthodes analytiques ont été utilisées ; la méthode DPPH (Venkatesan et Rao, 2000 ; Villaño *et al.*, 2007 ; De Pinedo *et al.*, 2007) et dans une moindre mesure la méthode ORAC_{FL} étant parmi les plus employées. À l'instar du test CAT, ces méthodes sont adaptées à l'analyse rapide en lecteur de microplaques, les rendant fort appropriées pour le criblage à large échelle et à haut débit de substances antioxydantes ou antiradicalaires.

La méthode DPPH proposée par Blois (1958), puis améliorée par Brand-Williams *et al.* (1995) est basée sur l'utilisation d'un radical libre stable et artificiel, le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl, dont les propriétés spectrales se manifestent par une forte absorption dans le domaine visible à 515 nm. La seconde méthode, ORAC_{FL} a été développée par Ou *et al.* (2001) et emploie un sel disodique de fluorescéine comme substrat oxydable fluorescent (λ_{ex} : 490 nm/ λ_{em} : 515 nm). Afin de comparer le test CAT avec ces deux méthodes existantes, la capacité antioxydante de dix composés phénoliques (acides gallique, férulique, protocatéchique, caféïque, chlorogénique et rosmarinique, ainsi que les flavonoïdes quercétine, myricétine, épicatechine et catéchine) (Fig. 47) a été évaluée par les tests DPPH, ORAC_{FL} et CAT. L'objectif a été d'établir pour chaque méthode une relation entre la structure moléculaire et la capacité antioxydante ou antiradicalaire. Pour faciliter la comparaison, les résultats ont été exprimés en moles d'équivalents Trolox par mole de composé testé (équivalent Trolox, ET). Il est à noter que l'expression des résultats en équivalent Trolox induit une variabilité accrue des résultats, puisqu'à l'erreur de mesure associée à la molécule testée, vient s'ajouter celle correspondant au Trolox.

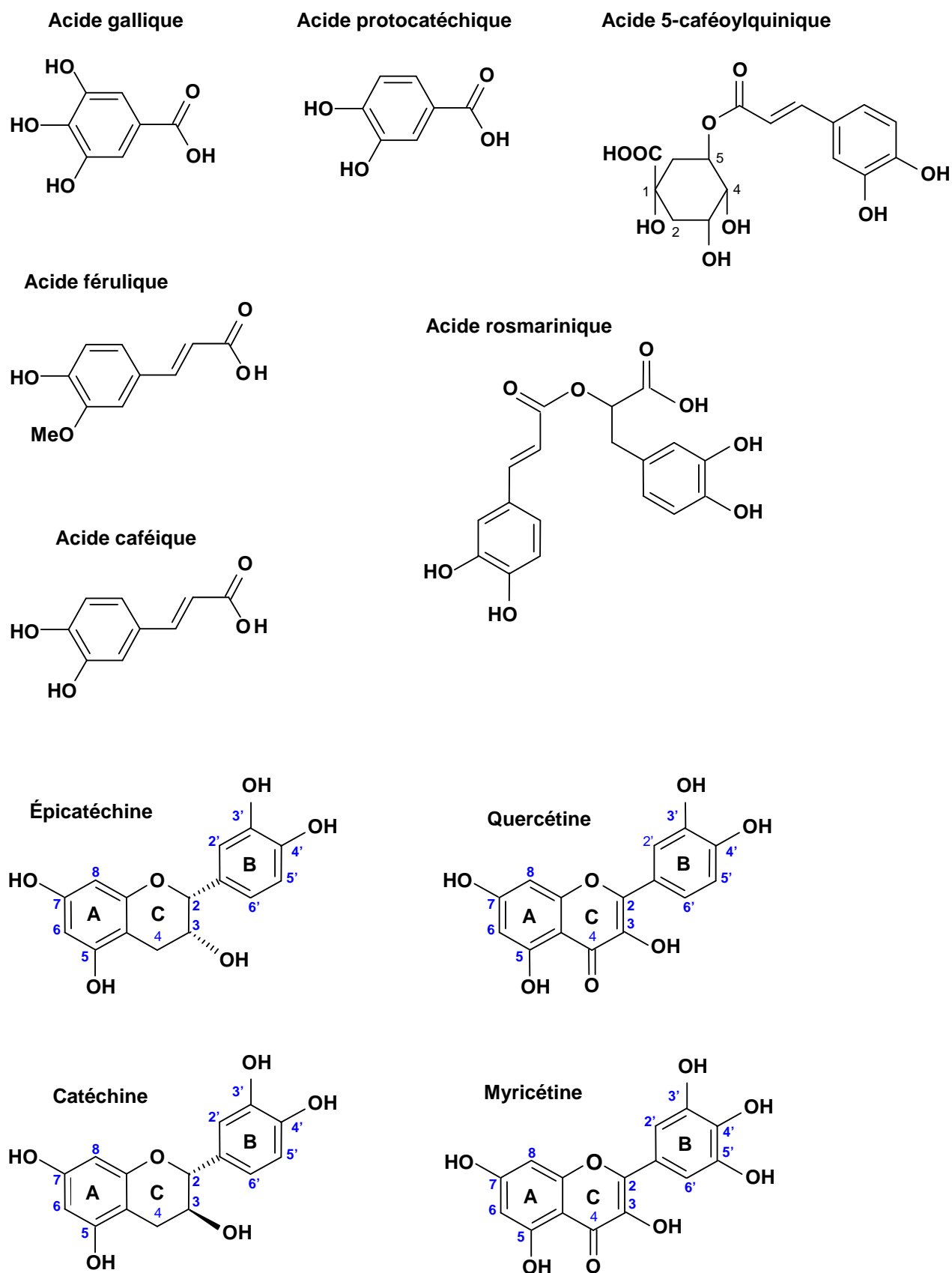


Fig. 47. Structure moléculaire des composés phénoliques testés.

2.1. MÉTHODE CAT

Pour tenter d'établir une relation entre la structure moléculaire et l'activité antioxydante de molécules phénoliques, dix composés modèles ont été évalués par la méthode CAT. Il s'agit de l'acide férulique ($1,20 \pm 0,29$ ET), de la myricétine ($1,32 \pm 0,31$ ET), de l'acide protocatéchique ($1,70 \pm 0,38$ ET), de l'acide caféique ($2,14 \pm 0,20$ ET), de la catéchine ($2,62 \pm 0,61$ ET) et de la quercétine ($3,48 \pm 0,26$ ET), mais également de l'acide gallique ($0,43 \pm 0,05$ ET), de l'épicatéchine ($2,38 \pm 0,03$ ET), de l'acide 5-caféoylquinique ($2,39 \pm 0,14$ ET) et de l'acide rosmarinique ($4,57 \pm 0,77$ ET) dont les résultats ont déjà été présentés dans le chapitre précédent (**Fig. 48**).

2.1.1. Analyse globale

Dans un premier temps, il semble clair que l'ordre d'efficacité antioxydante est gouverné par la présence de structure catéchol, puisque les acides gallique et férulique ainsi que la myricétine qui ne possèdent pas une telle structure, sont les plus faibles antioxydants, suivis des 6 composés comportant une structure catéchol et finalement, de l'acide rosmarinique seul composé à en présenter deux.

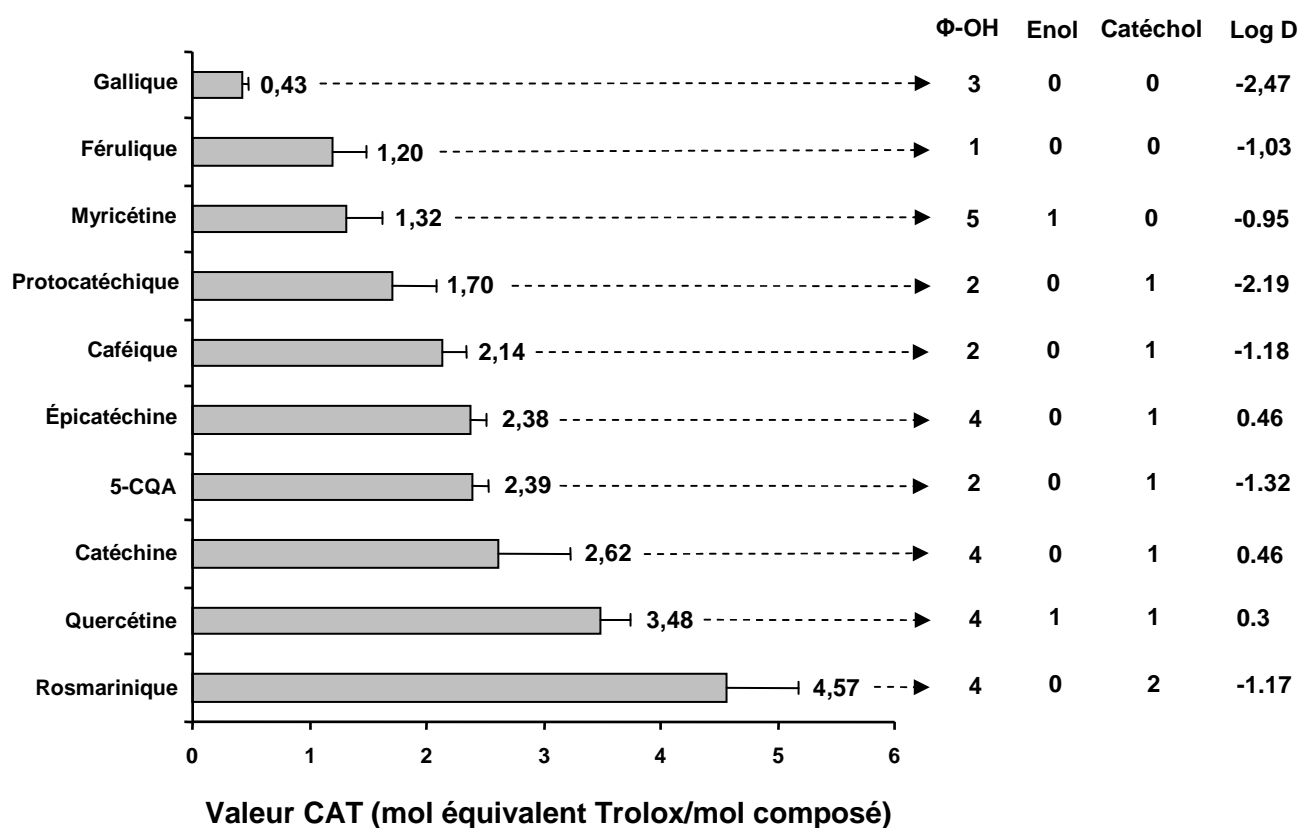


Fig. 48. Capacité antioxydante de dix composés phénoliques déterminée par la méthode CAT. L'acide 5-caféoylquinique est cité sous le terme 5-CQA.

Une régression linéaire entre la valeur CAT et le nombre de structure catéchol confirme une influence hautement significative (*valeur de Fischer (F)* : 33,6 ; *probabilité associée* : 0,0004 ; R^2 : 0,81) de ce paramètre structural. En termes de réactivité, l'importance de la structure catéchol est souvent expliquée par l'établissement d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre le radical (issu de la rupture homolytique de la liaison O-H) et l'hydroxyle phénolique adjacent (Santos et Simoes, 1998 ; Wright *et al.*, 2001). Cette liaison stabiliserait l'état radicalaire et, par définition, réduirait l'énergie de dissociation homolytique (BDE) des groupements hydroxyles phénoliques¹⁶.

Toutefois, le fait que 6 composés présentant la même structure catéchol (acides protocatéchique, caféique, 5-caféoylquinique, l'épicatéchine, la catéchine et la quercétine) exercent des valeurs CAT différentes, montre clairement que ce paramètre n'est pas le seul à gouverner la capacité antioxydante. Cette observation est à mettre en relation avec l'hypothèse de Cuvelier *et al.* (2000) selon laquelle la structure moléculaire seule ne permet pas de prédire l'activité antioxydante dans un milieu multiphasique comprenant une phase aqueuse et une phase huileuse. En effet, il semble nécessaire de considérer la polarité ou l'hydrophobie afin de renseigner la question relative à la localisation physique de l'antioxydant dans un milieu compartimenté. Dans cette optique, la valeur théorique de $\log P$ (log du ratio de partition entre l'octanol et l'eau) est souvent utilisée. Or, ce paramètre théorique n'est pertinent en milieu aqueux que lorsque les antioxydants sont présents sous leur forme neutre. Dans le cas du test CAT, réalisé à pH neutre (7,2), la fonction carboxylique des acides phénoliques (acides gallique, férulique, caféique, chlorogénique et rosmarinique) est très majoritairement dissociée, conférant à ces molécules un fort caractère hydrophile. Dans ce cas, l'utilisation d'un coefficient de partition prenant en compte les formes ionisées de la molécule s'avère nécessaire. Le $\log D$ théorique représentant le logarithme du ratio de partition entre l'octanol et l'eau des formes neutres et ionisées d'un composé - et prenant donc en compte l'influence du pH sur la partition - a par conséquent été calculé pour chaque composé testé (Fig. 48) au moyen de la procédure ChemSilico mentionnée dans la section 2.7 matériels et méthodes. Une régression linéaire entre la valeur CAT et la valeur de $\log D$ indique que ce paramètre de localisation n'est pas significativement impliqué dans le déterminisme de l'activité antioxydante indépendamment d'autres paramètres (F : 2,3 ; *probabilité associée* : 0,16 ; R^2 : 0,23). Néanmoins, lorsqu'une régression linéaire est réalisée entre (i) la valeur CAT d'une part et (ii) le nombre de structure(s) catéchol(s) associée(s) à la

¹⁶ Notons que l'établissement d'une telle liaison hydrogène est également à l'œuvre pour la structure pyrogallol rencontrée pour l'acide gallique ou la myricétine.

valeur de $\log D$ d'autre part, une influence hautement significative ($F : 24.6$; *probabilité associée* : 0,0007 ; $R^2 : 0,87$) de la combinaison de ces deux facteurs est détectée. L'équation qui décrit 87 % de l'information renfermée dans les valeurs CAT peut être exprimée comme suit (**équation 20**) :

$$\text{Valeur CAT} = 1,26 + 1,56 \times \text{nombre catéchol} + 0,31 \times \log D \quad (\text{Eq. 20})$$

Cette équation est bien évidemment simpliste, puisqu'une activité multifactorielle comme la valeur CAT est difficilement exprimable par deux facteurs uniques. Cependant, la forme générale de l'équation est intéressante, car il apparaît un paramètre de réactivité (nombre de catéchol) et un paramètre de localisation par rapport au substrat ($\log D$). Se profile ainsi une formule que nous postulons être commune à tous les antioxydants, et qui associerait à leur réactivité intrinsèque vis-à-vis des radicaux libres, une probabilité pour que cette réactivité s'exprime. Cette probabilité d'expression serait principalement gouvernée par la localisation de l'antioxydant par rapport au substrat oxydable.

Par ailleurs, compte tenu de la difficulté d'isoler l'effet propre de chaque paramètre structural sur l'ensemble des molécules, il nous a semblé judicieux, dans un deuxième temps, d'approfondir cette analyse par famille de composés phénoliques (acides phénoliques et flavonoïdes).

2.1.2. Étude spécifique des acides phénoliques

Le fait que la valeur CAT de l'acide gallique, contenant une structure pyrogallol (trois hydroxyles phénoliques adjacents), soit environ quatre fois plus faible que celle de son homologue (acide protocatéchique) présentant une structure de type catéchol témoigne de l'importance de ce paramètre (**Fig. 49**). Ce résultat est de prime abord surprenant puisque le calcul au niveau B3LYP/6-311G++(3df, 3pd) de la théorie de la fonctionnelle de la densité montre que le pyrogallol, à partir duquel dérive l'acide gallique, présente une BDE (289,4 kJ/mol) inférieure à celle du catéchol (312,8 kJ/mol), à partir duquel dérive l'acide protocatéchique ([Thavasi et al., 2006](#)). Les valeurs CAT peuvent néanmoins s'expliquer du fait que l'acide gallique est un réducteur plus puissant que l'acide protocatéchique. Aussi pouvons nous avancer l'hypothèse que l'acide gallique est susceptible – en marge de son action antioxydante vis-à-vis des radicaux libres – (i) de réduire l'oxygène moléculaire (autoxydation) et de former des espèces partiellement réduites de l'oxygène (ii) et/ou de réduire Fe^{3+} en Fe^{2+} , ce dernier étant un oxydant de type Fenton (**réaction 5**). Ces voies

réactionnelles que nous pouvons qualifier de « parasites » présentent donc un double inconvénient au regard de la capacité antioxydante : celui de générer des espèces qui vont accentuer le processus oxydatif, mais également celui de consommer prématurément l'antioxydant le rendant donc indisponible pour protéger le substrat oxydable. À cet égard, il est généralement admis que les composés contenant une structure catéchol ou pyrogallol ne se comportent pas uniquement en tant qu'antioxydants, mais peuvent être facilement oxydés par l'oxygène moléculaire pour former des espèces réactives de l'oxygène (EROs) (Miura *et al.*, 1998). De nombreuses études soulignent ainsi qu'en condition de pH neutre ou basique, les composés basés sur un squelette pyrogallol sont plus susceptibles à l'autoxydation que leurs homologues contenant une structure catéchol (Miura *et al.*, 1998 ; Mochizuki *et al.*, 2002 ; Roginsky et Alegria, 2005). Ce constat est d'ailleurs à rapprocher du fait qu'en milieu neutre ou basique, certains composés phénoliques présentant une structure pyrogallol (épigallocatechine et épigallocatechine gallate) sont beaucoup moins stables que des composés phénoliques présentant une structure catéchol comme l'épicatéchine (Zhu *et al.*, 1997). Enfin, en marge de ces effets électroniques, l'addition d'un hydroxyle phénolique supplémentaire s'accompagne d'une légère augmentation de l'hydrophilie ($\log D$: -2,47) par rapport à l'acide protocatéchique ($\log D$: -2,19) et donc d'un éloignement de la phase lipidique. Or, de toute évidence, dans un système émulsionné tel que rencontré dans la méthodologie CAT, seul un piégeage des peroxyradicaux à proximité des gouttelettes d'huile de tung permet de protéger le substrat oxydable de l'oxydation. Notons néanmoins qu'une telle influence semble improbable puisque, comme nous l'aborderons dans l'analyse des résultats obtenus avec la méthode ORAC_{FL} (pour laquelle le $\log D$ ne semble pas exercer d'effets), le même ordre d'efficacité antioxydante a été observé entre les composés phénoliques renfermant une structure pyrogallol et ceux comportant une structure catéchol.

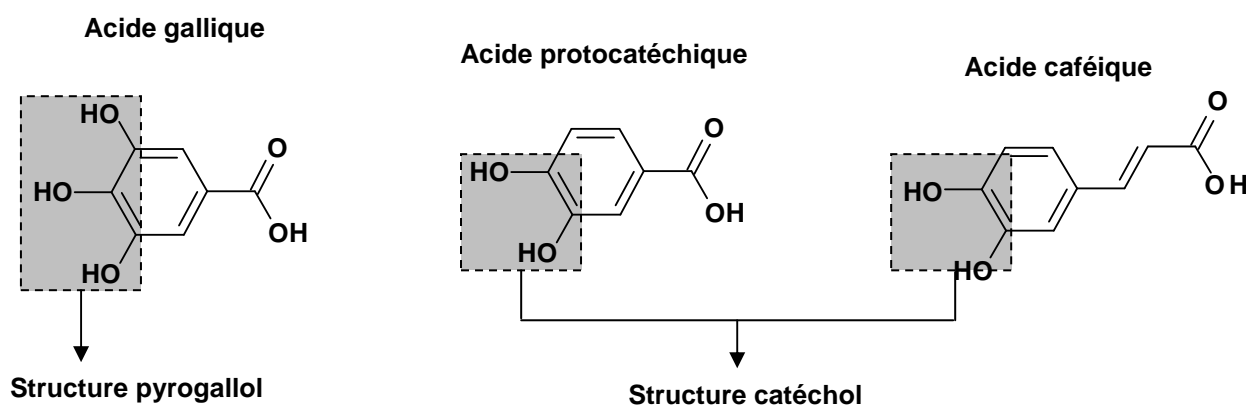


Fig. 49. Structure moléculaire des acides gallique, protocatéchique et caféique.

Par ailleurs, il semble que l'acide caféique exerce une capacité antioxydante supérieure à celle de l'acide protocatéchique (**Fig. 48**). Il est généralement admis que la présence d'une insaturation entre la fonction acide carboxylique et le cycle phénolique (cas de l'acide caféique) permet d'étendre la délocalisation électronique de l'électron non apparié par rapport à la présence d'un acide carboxylique directement substitué sur le cycle aromatique (cas de l'acide protocatéchique). En outre, la plus forte hydrophilie de l'acide protocatéchique (log D : - 2,19) par rapport à l'acide caféique (log D : - 1,18) devrait, en théorie, défavoriser ce dernier en termes d'efficacité antioxydante. Toutefois, le recouvrement des écart-types associés à leur valeur CAT ne permet pas de conclure de manière indubitable sur la différence d'activité entre les acides hydroxybenzoïque et hydroxycinnamique.

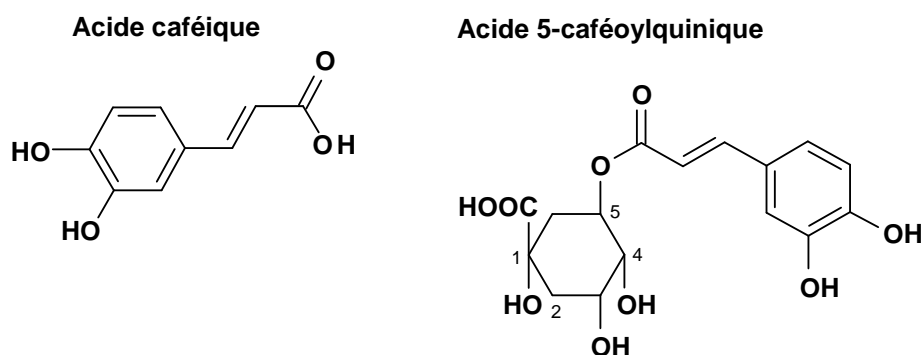


Fig. 50. Structure moléculaire des acides caféique et 5-caféoylquinique.

De manière analogue, la différence des valeurs CAT des acides caféique (2,14 ET) et 5-caféoylquinique (2,39 ET) souffre également d'un manque de significativité et ne permet pas de conclure sur un éventuel avantage (très modeste) que conférerait un motif quinique (**Figs. 48 et 50**).

2.1.3. Étude spécifique des flavonoïdes

En premier lieu, la moindre activité antioxydante de la myricétine (flavonol) comparée à la quercétine (flavonol), mais également par rapport aux flavan-3-ols (épicatéchine et catéchine) (**Fig. 48**), témoigne du rôle primordial de la structure de type catéchol dans le déterminisme de la capacité antioxydante. En d'autres termes, ce résultat rend compte de l'influence négative de la présence d'un groupement pyrogallol (trois hydroxyles phénoliques adjacents) par rapport au groupement catéchol (**Fig. 51**). Comme nous l'avons préalablement abordé pour les acides phénoliques, l'une des hypothèses possibles pour expliquer ce résultat pourrait être que le groupement pyrogallol constitue un meilleur réducteur de l'oxygène moléculaire

que la fonction catéchol (Miura *et al.*, 1998 ; Mochizuki *et al.*, 2002 ; Roginsky et Alegria, 2005). Ce type de réduction serait ainsi à l'origine de la formation d'EROs qui vont à leur tour oxyder l'huile de tung. Un tel mécanisme serait d'ailleurs favorisé par la présence éventuelle de métaux de transition à l'état de traces dans le tampon phosphate, ainsi que par les conditions de pH neutre rencontrées dans la méthode CAT. Notons également que de telles réactions présentent l'inconvénient supplémentaire de consommer prématurément l'antioxydant, le rendant donc indisponible pour protéger l'huile de tung.

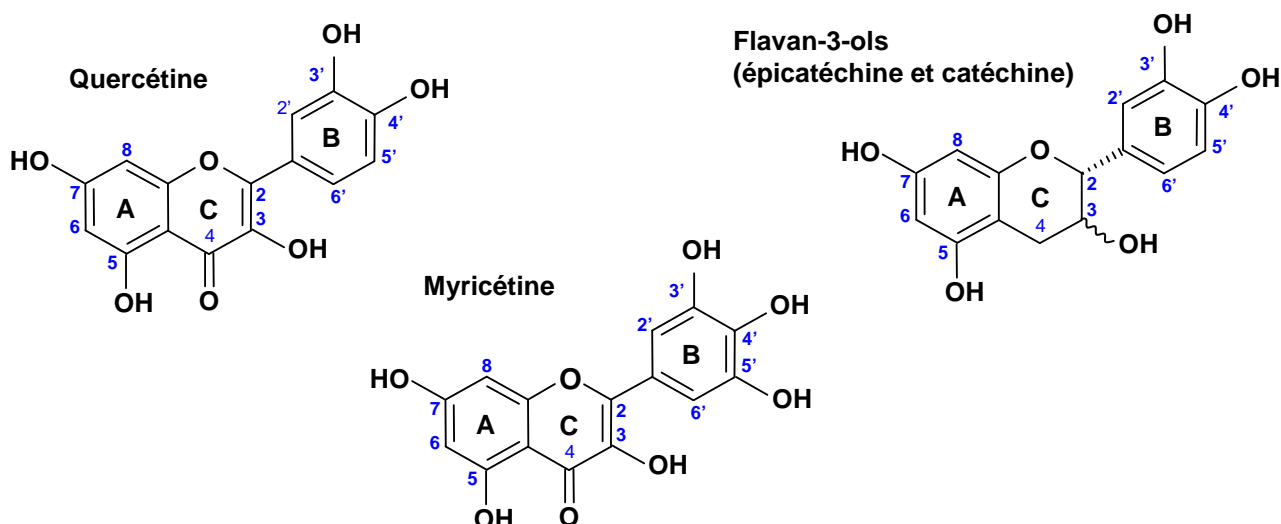


Fig. 51. Structure moléculaire des flavan-3-ols (épicatechine et catéchine), de la quercétine et de la myricétine.

En marge de la réactivité, les effets liés à la localisation de l'antioxydant sont également à prendre en compte. Dans ce contexte, il ne peut être écarté que la plus faible efficacité antioxydante de la myricétine comparée à la quercétine, à l'épicatechine et à la catéchine provienne de l'augmentation de la polarité due à l'addition d'un hydroxyle phénolique supplémentaire. Cette augmentation de la polarité est ainsi supposée conduire à un éloignement de la myricétine vis-à-vis du substrat oxydable que constitue l'huile de tung, et par conséquent, à un piégeage préférentiel des peroxyradicaux dans la phase aqueuse.

Sur un autre plan, la forte activité antioxydante de la quercétine par rapport à ces homologues de la famille des flavan-3-ols (épicatechine et catéchine) démontre l'importance de la double liaison C_2-C_3 sur l'hétérocycle C en conjugaison avec la fonction cétone en position 4 du même cycle. En effet, cette configuration est supposée étendre la délocalisation de l'électron non apparié résultant de la cession de l'atome hydrogène le plus labile, c'est-à-dire celui porté en $O4'$ (Trouillas *et al.*, 2006) jusqu'à la fonction 4-oxo du cycle C (Bors *et al.*, 1990). En

corollaire, une telle extension de la délocalisation électronique augmente le nombre de formes mésomères du radical quercétyle. Notons cependant que [Van Acker *et al.* \(1996 b\)](#) ont calculé que la densité de spin était essentiellement localisée sur l'atome d'oxygène impliqué dans la rupture homolytique d'un hydrogène. D'après leur calcul théorique, 84 % de la densité de spin totale serait localisée sur l'atome O4' (**Fig. 52**), minimisant de ce fait l'importance de l'extension de la délocalisation induite par la double liaison et la cétone de l'hétérocycle C, puisque l'électron non apparié y serait faiblement délocalisé. Cela est pour le moins surprenant, puisque la structure délocalisée de la quercétine était jusqu'alors tenue pour responsable de la stabilisation du radical ([Rice-Evans *et al.*, 1996](#) ; [Bors *et al.*, 1990](#)).

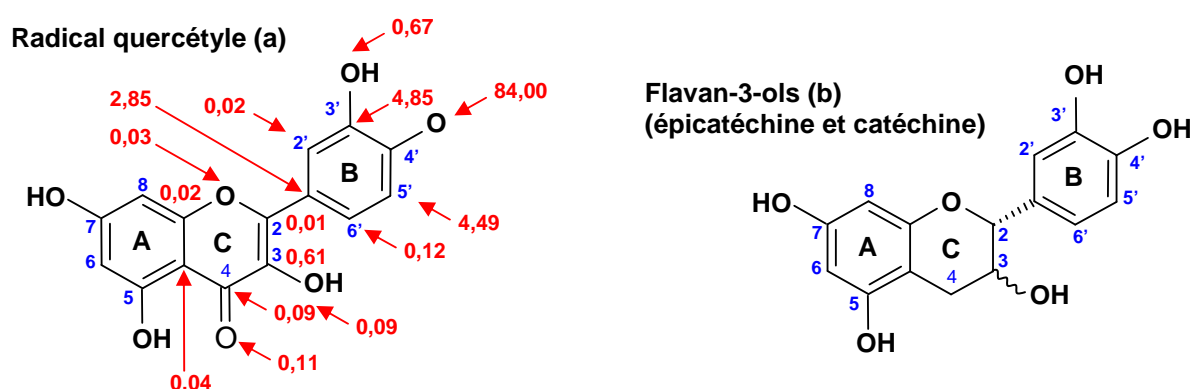


Fig. 52. Distribution de spin (%) du radical quercétyle après rupture homolytique de la liaison O4'-H (a). D'après [van Acker *et al.* \(1996 b\)](#). Structure chimique des flavan-3-ols comme l'épicatéchine et la catéchine (b).

Si l'hydrogène le plus labile des flavan-3-ols (épicatéchine et catéchine) est également en O4', l'argument d'une meilleure délocalisation électronique pour la quercétine peut sembler discutable. Dans le cas théorique où la meilleure efficacité de la quercétine n'implique pas une meilleure délocalisation par la présence de la double liaison et/ou du groupement 4-oxo, ces derniers pourraient tout de même jouer un rôle en formant une fonction énole en position 3 de l'hétérocycle C, alors que la catéchine et l'épicatéchine présente une fonction alcool secondaire sur cette position (**Fig. 52**). Ainsi, d'après [Trouillas *et al.* \(2006\)](#) la fonction énole en position 3 présente une BDE intermédiaire entre les hydroxyles du cycle B et ceux du cycle A. Le classement par ordre croissant des BDEs de la quercétine a été établi comme suit : O4'-H (cycle B) < O3'-H (cycle B) < O3-H (énole de l'hétérocycle C) < O7-H (cycle A) < O5-H (cycle A) ; les énergies associées étant comprises entre + 74,6 et + 88,6 kcal/mol. Lors de l'abstraction d'un hydrogène sur la fonction énole 3-OH, la densité de spin se répartit aussi bien sur l'atome oxygène O³ que sur l'atome de carbone C², pouvant expliquer ainsi la

réactivité de la quercétine sur ce site particulier. Ce résultat est à mettre en relation avec ceux obtenus par Kano *et al.* (1994) et Dangles *et al.* (1999 a et b) indiquant que le mécanisme antioxydatif de la quercétine implique l'hétérocycle C pour donner lieu à une forme quinone. Comme le reporte Russo *et al.* (2000) cette situation ne peut avoir lieu si la rupture homolytique met en jeu le groupe C⁴'O-H, mais devient possible dans le cas d'une cession d'atome hydrogène du groupe énotique en position 3 de l'hétérocycle C. En corollaire, la présence de l'insaturation C²-C³ et de l'hydroxyle en position 3 ne semble pas avantager la quercétine par rapport à l'épicatéchine et à la catéchine lors de la première cession d'un atome hydrogène impliquant le groupe C⁴'O-H. Par contre, dès que la rupture homolytique a lieu sur l'énol en position 3, ces paramètres structuraux présentent un double avantage : celui bien évidemment de constituer un groupement énotique et celui de permettre une bonne délocalisation électronique de la forme radicalaire résultante. Poursuivant ce raisonnement, la quercétine ne serait pas plus efficace que les flavanols lors de son introduction dans le milieu réactionnel du test CAT, mais le deviendrait lors de la rupture homolytique de l'énol qui aurait vraisemblablement lieu lors de la troisième action antioxydante d'après les calculs de Trouillas *et al.* (2006).

2.2. MÉTHODE ORAC_{FL}

La méthode ORAC_{FL} est un test de détermination de l'activité antioxydante basé sur les propriétés de fluorescence du sel disodique de fluorescéine. Cette sonde fluorescente émet vers 515 nm suite à une excitation vers 490 nm, mais perd ses propriétés spectrales une fois oxydée par des peroxyradicaux générés par l'AAPH en milieu aqueux tamponné (pH 7.4) ; cette chute de fluorescence étant enregistrée en fonction du temps dans une microplaque noire de 96 puits. Lorsqu'un antioxydant est ajouté, une réduction des peroxyradicaux a lieu, les rendant indisponibles pour oxyder la fluorescéine, ce qui se traduit par un ralentissement dose-dépendant de la chute de fluorescence.

Dans le but d'établir une relation entre la structure moléculaire et l'activité antioxydante de molécules phénoliques, 10 composés modèles (**Fig. 47**), préalablement analysés par la méthode CAT, ont été soumis à la procédure ORAC_{FL}. Les valeurs listées sur la **Fig. 53** s'échelonnent comme suit : acide gallique ($1,14 \pm 0,04$ équivalent Trolox, ET) < myricétine ($3,29 \pm 0,83$ ET) ~ acide férulique ($3,46 \pm 0,21$ ET) ~ acide 5-caféoylquinique ($3,71 \pm 0,46$ ET) < acide protocatéchique ($5,32 \pm 0,58$ ET) ~ acide caféique ($5,47 \pm 0,34$ ET) <

épicatéchine ($7,55 \pm 0,41$ ET) < catéchine ($8,33 \pm 1,26$ ET) ~ acide rosmarinique ($8,35 \pm 1,17$ ET) ~ quercétine ($8,67 \pm 0,63$ ET).

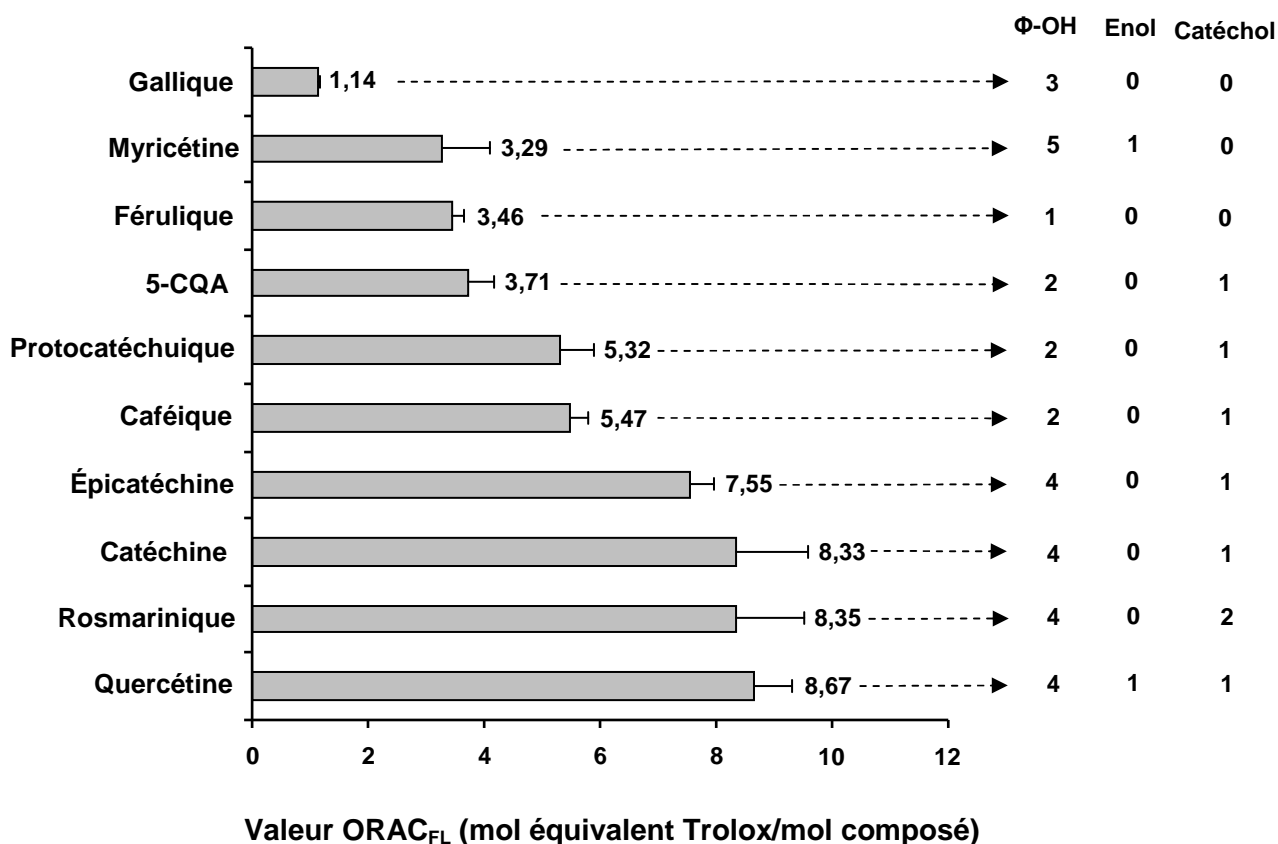


Fig. 53. Capacité antioxydante de dix composés phénoliques déterminée par la méthode ORAC_{FL}. L'acide 5-caféoylquinique est cité sous le terme 5-CQA.

2.2.1. Analyse globale

Globalement il est évident que le nombre d'hydroxyles phénoliques n'est pas impliqué dans le déterminisme de l'activité antioxydante telle que mesurée dans la méthode ORAC_{FL}. En effet, l'acide gallique présentant trois hydroxyles phénoliques est presque 2,5 fois moins efficace que l'acide férulique présentant un seul hydroxyle phénolique. De même la myricétine qui possède le plus grand nombre de OH exerce par ailleurs l'une des plus faibles capacités antioxydantes. Une régression linéaire établie entre la valeur ORAC_{FL} et le nombre d'hydroxyles phénoliques confirme l'absence d'effet significatif de ce paramètre structural ($F : 1,65$; probabilité associée : 0,23 ; $R^2 : 0,17$).

En considérant en revanche le nombre de structure(s) catéchol(s), une influence hautement significative a été mise en évidence ($F : 11,88$; probabilité associée : 0,009 ; $R^2 : 0,60$). En effet, ce sont les trois molécules exemptes de structure catéchol qui ont exercé les plus faibles valeurs ORAC_{FL}, les autres composés phénoliques en possédant au moins une.

2.2.2. Étude spécifique des acides phénoliques

De manière analogue à la méthodologie CAT, l'acide gallique exerce la plus faible capacité antioxydante. Ce résultat montre que la présence d'une structure pyrogallol abaisse drastiquement la capacité antioxydante par rapport à son homologue présentant une structure catéchol (acide protocatéchique). Cet effet semble exclusivement lié à la réactivité de la molécule. Effectivement, les effets liés au caractère hydrophile légèrement plus élevé de l'acide gallique par rapport à l'acide protocatéchique ne semblent pas entrer en jeu dans un système homogène aqueux tel que rencontré dans la méthodologie ORAC_{FL}. En revanche, nous pouvons avancer l'hypothèse, en accord avec les résultats expérimentaux de [Miura *et al.* \(1998\)](#), [Mochizuki *et al.* \(2002\)](#) et [Roginsky et Alegria \(2005\)](#), que les composés phénoliques renfermant une structure pyrogallol sont de meilleurs réducteurs de l'oxygène moléculaire que les molécules comportant une structure catéchol. De ce fait, les composés basés sur un squelette pyrogallol sont supposés produire davantage d'EROs que leurs homologues renfermant une structure catéchol, ces EROs pouvant par la suite accentuer l'oxydation de la fluorescéine. D'autre part, l'autoxydation des composés « pyrogalloliques » va nécessairement conduire à une consommation prématurée de ces antioxydants.

Concernant les acides hydroxycinnamiques, l'acide férulique qui ne possède pas de structure catéchol exerce une capacité antioxydante plus faible que ses homologues présentant une telle structure. En revanche, le fait que la valeur ORAC_{FL} de l'acide caféique soit significativement plus forte que celle de l'acide 5-caféoylquinique est plus délicat à expliquer. En effet, en termes de cession d'un atome hydrogène, la présence d'un groupement à effet mésomère attracteur d'électron comme la chaîne latérale -CH=CH-COOR conduit généralement à une augmentation de la BDE des liaisons O-H associées ([Dangles, 2006](#)). Or, les acides caféique et 5-caféoylquinique possèdent tous les deux cette chaîne latérale à effet mésomère attracteur d'électron (**Fig. 54**). En revanche, si l'on admet que la dissociation de la fonction acide induit une diminution de cet effet mésomère ([Saito et Kawabata, 2006](#)), il devient alors plus aisé de conclure à la réactivité supérieure de l'acide caféique par rapport à l'acide 5-caféoylquinique, la fonction acide de ce dernier étant impliquée dans une liaison ester avec l'acide quinique.

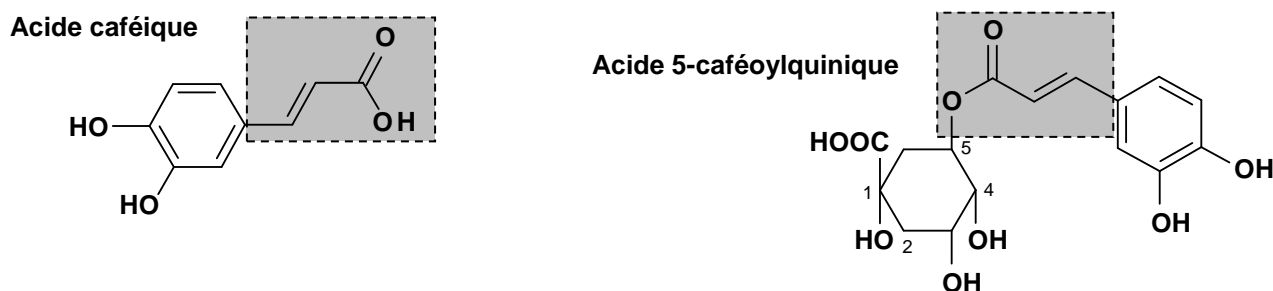


Fig. 54. Structure moléculaire des acides caféique et 5-caféoylquinique. L'insert grisé correspond au groupement à effet mésomère attracteur d'électron.

Par ailleurs, comme nous l'avons préalablement observé avec la méthode CAT, aucune différence significative n'a été constatée entre les acides protocatéchique et caféique. Enfin, l'acide rosmarinique présentant deux structures catéchols exerce une capacité antioxydante beaucoup plus élevée que l'ensemble des autres acides phénoliques, démontrant ainsi à nouveau, l'importance de la structure catéchol.

2.2.3. Étude spécifique des flavonoïdes

Si dans la méthode CAT la quercétine exerçait une capacité antioxydante significativement plus forte que la catéchine, cet ordre d'efficacité est moins flagrant avec la méthode $ORAC_{FL}$, comme en témoigne le recouvrement des écart-types associés aux valeurs pour ces deux flavonoïdes. L'épicatéchine présente, quant à elle, une valeur $ORAC_{FL}$ inférieure à celle de la quercétine, bien que la différence soit très modeste. Or comme nous l'avons abordé précédemment, la présence d'une insaturation C^2-C^3 associée à la fonction énon en position 3 de l'hétérocycle C pour la quercétine, est supposée lui conférer un avantage déterminant sur les flavan-3-ols en termes d'effet antioxydant. Ces données semblent confirmer l'hypothèse formulée par [Van Acker et al. \(1998 b\)](#) selon laquelle la structure du cycle B déterminerait majoritairement l'activité antioxydante ; la configuration des autres cycles ayant vraisemblablement peu d'influence.

D'autre part, il apparaît sur la **Fig. 53** que la myricétine exerce une capacité antioxydante beaucoup plus faible que la quercétine, alors que ces flavonols ne diffèrent entre eux que par la présence d'une structure de type de catéchol (cas de la quercétine) ou pyrogallol (cas de la myricétine) sur le cycle B (**Fig. 55**). Ce résultat étend aux flavonoïdes l'observation, préalablement établie sur les acides hydroxybenzoïques (que ce soit avec la méthode CAT ou $ORAC_{FL}$), que la substitution d'une structure catéchol par une structure pyrogallol conduit à une diminution drastique de la capacité antioxydante, alors même que de manière paradoxale,

cette substitution conduit à une augmentation de la capacité réductrice. Ce paradoxe n'en est plus un si l'on considère que l'avantage conféré aux composés « pyrogalloliques » d'une plus forte capacité réductrice vis-à-vis des radicaux libres, est contrebalancé par l'inconvénient d'une plus forte génération d'espèces réactives de l'oxygène induite par une augmentation de la capacité à réduire l'oxygène moléculaire. Cette observation conduit donc à établir une distinction franche entre la capacité antioxydante et la capacité réductrice, lesquelles sont pourtant fréquemment considérées comme étant équivalentes. Ainsi, d'après la définition de référence donnée par Halliwell et Gutteridge (1995), un antioxydant est « *une substance qui, en faible concentration par rapport au substrat, inhibe ou prévient l'oxydation de ce dernier* ». De ce point de vue, la capacité antioxydante ne peut pas être simplement ramenée à la capacité réductrice, mais plutôt à la capacité à protéger un substrat oxydable, ce qui peut s'avérer complètement différent. Selon cette acception, les termes « antioxydant » et « protecteur de substrat oxydable » sont de parfaits synonymes. Ainsi, un réducteur fort n'est pas forcément un « protecteur » puissant et donc un antioxydant puissant. En effet, un composé doté d'une forte capacité réductrice verra certes sa capacité antioxydante augmenter avec sa *capacité à réduire* des espèces oxydantes (comme les peroxyradicaux générés par l'AAPH), mais verra également sa capacité antioxydante diminuer avec sa *capacité à réduire* des espèces « faiblement » oxydantes (O_2 , Fe^{3+} ...) en espèces « fortement » oxydantes (ERO, Fe^{2+} ...). Entre autres paramètres d'influence, la capacité antioxydante peut donc être considérée comme la résultante des effets inhérents aux différents processus de réduction ayant lieu dans un système considéré, certains allant dans le sens d'une amélioration de la capacité antioxydante (au sens de protection d'un substrat oxydable), d'autres en revanche diminuant cette capacité.

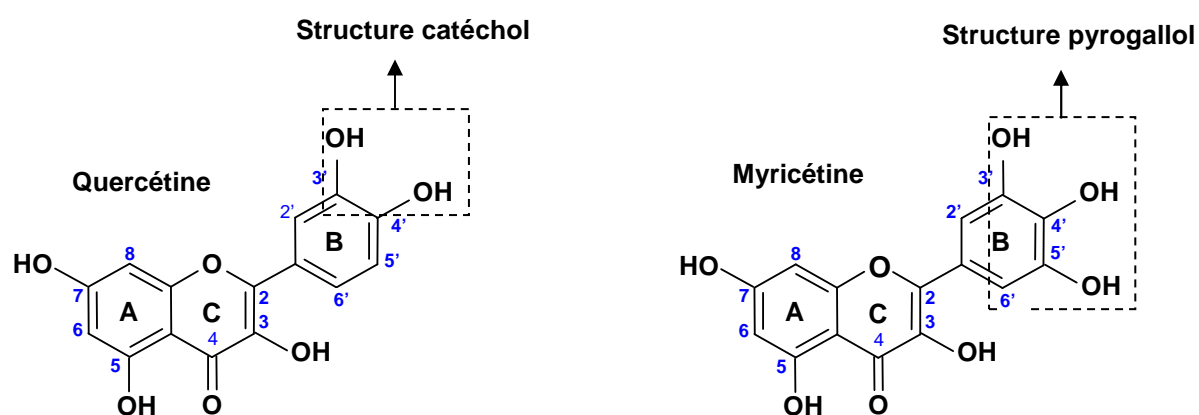


Fig. 55. Structure moléculaire de la quercétine et de la myricétine.

2.3. MÉTHODE DPPH

La méthode DPPH est un test de détermination de l'activité antioxydante utilisant un radical libre artificiel et stable, le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]). Ce radical libre centré sur l'azote (**Fig. 19**) présente la particularité d'absorber dans le domaine visible à 510-520 nm. Le principe général de ce test repose sur la chute d'absorption du DPPH[•] par réduction de son état radicalaire par un antioxydant.

Pour tenter d'établir une relation entre la structure moléculaire et l'activité antiradicalaire de molécules phénoliques, 10 composés modèles (préalablement analysés par les méthodes CAT et ORAC_{FL}) ont été soumis à la procédure DPPH. Les valeurs listées sur la **Fig. 56** s'échelonnent comme suit : acide férulique ($0,63 \pm 0,07$ équivalent Trolox, ET) < acide caféique ($1,70 \pm 0,15$ ET) < acide gallique ($2,64 \pm 0,19$ ET) < acide protocatéchique ($2,71 \pm 0,14$ ET) < catéchine ($2,88 \pm 0,2$ ET) < acide 5-caféoylquinique ($2,95 \pm 0,22$ ET) < myricétine ($2,97 \pm 0,24$ ET) < épicatechine ($3,13 \pm 0,15$ ET) < quercétine ($3,63 \pm 0,35$ ET) < acide rosmarinique ($4,36 \pm 0,12$ ET).

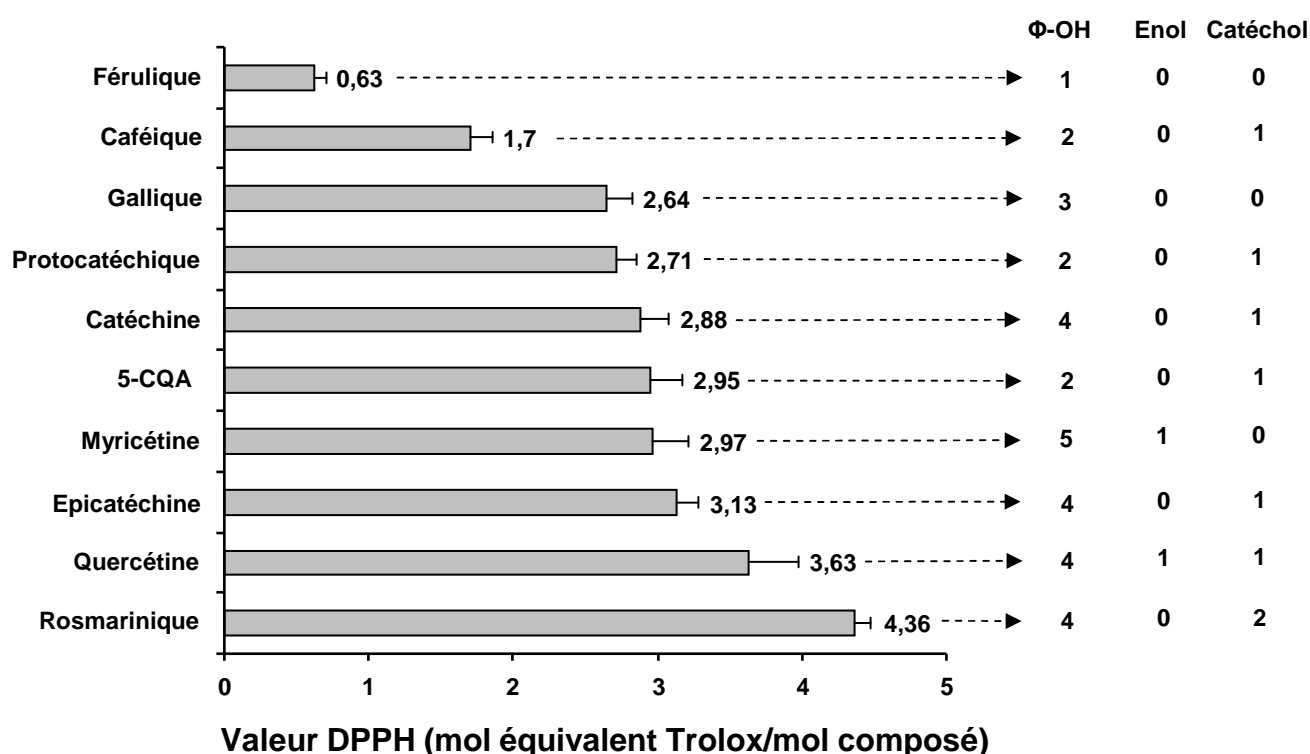


Fig. 56. Capacité antioxydante de dix composés phénoliques déterminée par la méthode DPPH. L'acide 5-caféoylquinique est cité sous le terme 5-CQA.

2.3.1. Analyse globale

De prime abord, en se focalisant sur les deux extrêmes que constituent les acides férulique et rosmarinique, il semble que la capacité antiradicalaire mesurée par le test DPPH soit gouvernée par le nombre d'hydroxyles phénoliques. En effet, l'acide férulique qui renferme le plus faible nombre d'hydroxyles aromatiques (un) exerce la plus faible valeur DPPH (0,63 TE), tandis que l'acide rosmarinique présentant quatre hydroxyles phénoliques exerce la plus forte valeur DPPH (4,36 TE). Cependant, l'examen des valeurs intermédiaires démontre clairement que la tendance n'est pas exclusivement gouvernée par le nombre d'hydroxyles phénoliques. Ce constat est particulièrement frappant si l'on considère le cas de l'acide 5-caféoylquinique (2 OH) qui exerce une activité antiradicalaire similaire à la catéchine (4 OH). Notons également que l'acide gallique contenant trois hydroxyles phénoliques exerce une activité antioxydante similaire, sinon moindre par rapport à l'acide 5-caféoylquinique qui en contient deux. La régression linéaire établie entre les valeurs DPPH et le nombre d'hydroxyles phénoliques confirme l'absence de significativité de ce paramètre structural ($F : 9,13$; *probabilité associée* : 0,01 ; $R^2 : 0,53$). La prise en compte de l'hydroxyle énoïque en position 3 de l'hétérocycle C (quercétine et myricétine) associée aux hydroxyles phénoliques abaisse même la significativité ($F : 6,7$; *probabilité associée* : 0,03 ; $R^2 : 0,46$). De manière analogue au nombre d'hydroxyles phénoliques, une régression linéaire établie entre le nombre de structure catéchol et les valeurs DPPH n'a montré aucune significativité ($F : 5,3$; *probabilité associée* : 0,05 ; $R^2 : 0,40$).

En définitive, l'analyse globale des déterminants physicochimiques de l'activité de piègeur de radicaux DPPH[•] ne permet pas d'isoler l'effet propre de certains facteurs, ce qui limite l'étude de la relation structure-activité. De ce point de vue, une analyse comparative au sein d'une famille de composés phénoliques, permettrait éventuellement d'affiner cette relation, mais surtout de limiter le nombre de facteurs confondus. Les deux parties suivantes seront donc consacrées à l'analyse des acides phénoliques et des flavonoïdes. Enfin, dans une troisième section, l'analyse stœchiométrique des composés phénoliques sera plus spécifiquement abordée.

2.3.2. Étude spécifique des flavonoïdes

Concernant les flavonoïdes, la forte activité antiradicalaire de la quercétine par rapport à ces homologues de la famille des flavan-3-ols (épicatechine et catéchine) est probablement à rapprocher de la faible BDE de la fonction énoï en position 3 de l'hétérocycle C (**Fig. 57**). La plus faible activité de la myricétine par rapport à la quercétine montre quant à elle l'influence négative de l'addition d'un hydroxyle phénolique en *ortho* de la fonction 3',4'-dihydroxy du

cycle B. Cependant, contrairement aux résultats obtenus avec les méthodes CAT et ORAC_{FL}, la substitution de la structure catéchol par une structure pyrogallol n'induit pas une chute importante de la capacité antioxydante. Comme nous l'avons préalablement postulé, la moindre efficacité antioxydante des composés basés sur une structure pyrogallol par rapport à ceux comportant une structure catéchol, est probablement à mettre en relation avec la plus forte capacité réductrice des composés « pyrogalloliques » par rapport à leurs homologues « catécholiques ». Cette forte capacité réductrice est en effet supposée accroître la génération d'espèces réactives de l'oxygène par réduction de l'oxygène moléculaire et des traces de cations métalliques. Or, il est surprenant d'observer que dans le milieu DPPH, la substitution d'une structure catéchol par une structure pyrogallol ne s'accompagne pas d'une diminution aussi drastique de la capacité antioxydante que celle observée avec les méthodes CAT et ORAC_{FL}. En effet, le test DPPH étant réalisé en milieu méthanolique dans lequel l'oxygène est plus soluble que dans l'eau, une plus forte contribution de la réduction de l'oxygène en ERO est supposée avoir lieu. De surcroît, les plus faibles températures rencontrées dans la méthode DPPH (25°C) par rapport à celles employées pour les méthodes CAT et ORAC_{FL} (37°C) doivent en théorie accroître la solubilisation de l'oxygène et donc les quantités d'EROs produites, puisqu'il est admis que la solubilité de l'oxygène augmente lorsque la température diminue. À l'opposé de ce raisonnement, la réduction des traces de cations métalliques permettrait d'expliquer que le passage d'une fonction pyrogallol à une fonction catéchol s'accompagne d'une plus faible diminution de l'activité antioxydante dans la méthode DPPH comparée aux méthodes CAT et ORAC_{FL}. Il est en effet vraisemblable qu'il y ait moins de traces métalliques dans le méthanol (milieu DPPH) qu'en milieu aqueux (CAT et ORAC_{FL}).

Notons toutefois que ces hypothèses sont peu probables et qu'il semble plus vraisemblable de considérer que le test DPPH ne permet pas de prendre en compte la génération éventuelle d'ERO ou de Fe²⁺. En effet, cette méthode, par le mode de détection qu'elle emploie, permet seulement de mesurer la capacité d'une molécule à réduire le radical DPPH[•]. Aussi pouvons nous avancer l'hypothèse que dans les méthodes CAT et ORAC_{FL}, la génération d'EROs par autoxydation des composés phénoliques présente le double inconvénient de générer des espèces susceptibles d'accélérer l'oxydation du substrat oxydable mais également de consommer prématurément le composé phénolique. Dans le test DPPH en revanche, seul ce dernier effet négatif pourra être détecté, puisque le système d'étude n'implique pas de substrat oxydable. Cette hypothèse pourrait donc expliquer que la diminution de l'effet antioxydant consécutif au passage d'une structure catéchol à une structure pyrogallol soit beaucoup moins marquée dans le test DPPH.

Enfin, bien que les écart-types associés aux valeurs se chevauchent (**Fig. 56**), l'épicatéchine semble présenter une meilleure capacité à piéger le DPPH[•], que son isomère, la catéchine. Ce

résultat précédemment reporté par Villaño *et al.* (2007) provient vraisemblablement d'un effet stérique, puisque la catéchine (2*R,3*S) est plus encombrée que l'épicatéchine (2*R,3*R) (**Fig. 57**). Il est cependant à noter que la cinétique de réduction du DPPH[•] par l'épicatéchine a été plus lente que celle de la catéchine. Dans ce cas de figure, le fait de ne pas prendre en compte de paramètres cinétiques dans le calcul de la valeur DPPH peut biaiser la relation structure-activité.

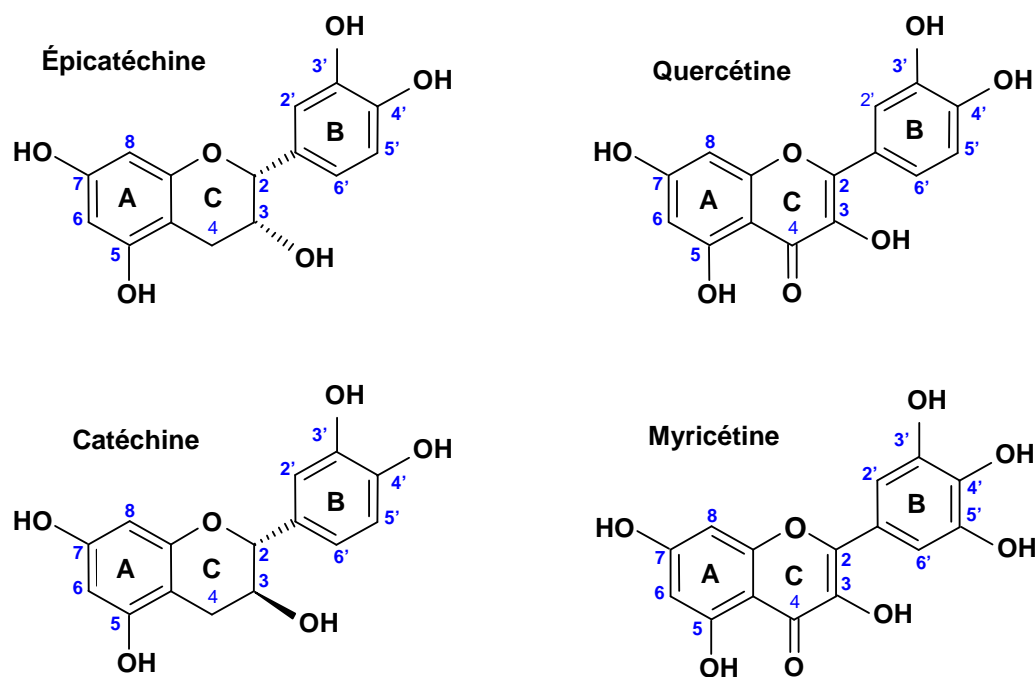


Fig. 57. Structure moléculaire des flavonoïdes testés.

2.3.3. Étude spécifique des acides phénoliques

Concernant les acides phénoliques, les acides hydroxybenzoïques semblent être de meilleurs piègeurs de radicaux DPPH[•] que les acides hydroxycinnamiques, puisqu'à nombre égal de motif catéchol, l'acide caféique exerce une activité significativement plus faible que son homologue hydroxybenzoïque, l'acide protocatéchique. Cette observation est surprenante du fait que la conjugaison du cycle aromatique avec la chaîne latérale de l'acide caféique offre une délocalisation électronique plus importante que celle de l'acide protocatéchique. Or, il est habituellement considéré que la BDE d'un groupement phénolique diminue avec la possibilité de stabiliser le radical correspondant par de multiples formes mésomères. D'autre part, aucune différence significative n'a été observée entre les acides gallique et protocatéchique, confirmant l'analyse globale qui avait conclu à l'absence d'effet de la structure catéchol. Ce constat est toutefois à nuancer par le fait que l'acide rosmarinique exerçant la plus forte valeur DPPH est le seul acide phénolique à comporter deux structures catéchols (**Fig. 58**).

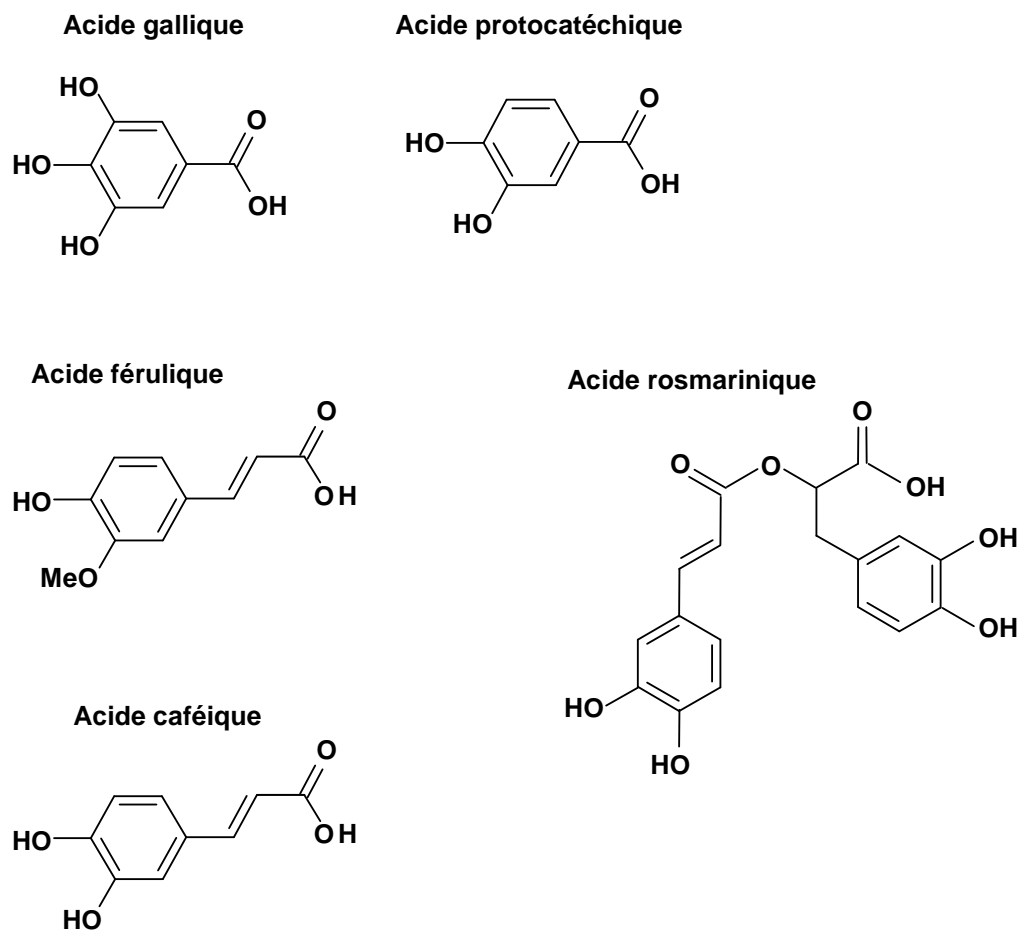


Fig. 58. Structure moléculaire des acides phénoliques testés.

Finalement, ces différents résultats contradictoires en apparence nous ont conduits à modifier l'analyse classique de la relation structure-activité, pour étudier plus spécifiquement la stœchiométrie des réactions de réduction du radical DPPH par les composés phénoliques.

2.3.4. Étude stœchiométrique

Le mode d'expression des résultats adopté dans la méthode DPPH (EC_{50}) peut donner accès au nombre de radicaux DPPH[•] réduits à l'état stationnaire. En effet, multiplier l' EC_{50} par deux, permet de renseigner le nombre de mole d'antioxydant par mole de DPPH[•] nécessaire pour atteindre l'état stationnaire de la réaction de réduction. L'inverse de ce paramètre ($1/(2 \times EC_{50})$) donne donc accès au nombre de mole de radicaux DPPH[•] réduits par mole de composé phénolique à l'état stationnaire, ce qui correspond à la stœchiométrie finale de la substance antiradicalaire considérée (Brand-Williams *et al.*, 1995).

On considère pour chaque composé qu'il y a deux types de stœchiométries concernant la réduction du radical DPPH[•]. (i) La première, appelée *stœchiométrie de base*, consiste en une

stœchiométrie virtuelle déductible du nombre d'hydroxyles phénoliques présent dans la molécule initiale. À titre d'exemple, pour l'acide 5-caféoylquinique présentant 2 hydroxyles phénoliques, une stœchiométrie de base apparente de 2 sera attribuée. (ii) La deuxième stœchiométrie, appelée *stœchiométrie finale*, est déterminée expérimentalement ($1/(2 \times EC_{50})$) comme étant le nombre mole de radicaux DPPH[•] piégés par mole d'antioxydant jusqu'à l'obtention d'un état stable. Cette stœchiométrie finale correspond donc au nombre total de réduction, jusqu'à consommation complète de l'antioxydant (6 h pour les acides férulique, gallique, protocatéchique, 5-caféoylquinique, la catéchine, la quercétine et la myricétine ; 12 h pour l'acide caféique, l'épicatéchine et l'acide rosmarinique). Or, il est de prime abord surprenant de constater que la stœchiométrie finale de tous les composés phénoliques testés (exception faite de l'acide férulique) excède la stœchiométrie de base. De nombreux auteurs ont observé ce type d'« asymétrie » pour les composés phénoliques (Silva *et al.*, 2000 ; Brand-Williams *et al.*, 1995, Goupy *et al.*, 2003, Saito *et al.*, 2004 ; 2005 ; 2006), laissant penser que ce comportement pourrait être commun à une grande majorité de composés phénoliques. En admettant le cas idéal pour lequel les hydroxyles phénoliques de la molécule de base sont les seuls donneurs d'atome hydrogène, il se passe durant la réaction complète, des réductions qui sont inexpliquées par la stœchiométrie de base et qui peuvent être exprimées comme la différence entre la stœchiométrie finale et la stœchiométrie de base. Se pose alors la question de la nature de ces réductions non expliquées, mais également de leur contribution dans la stœchiométrie finale.

| Composé | Stœchiométrie de base | Stœchiométrie finale | Réductions inexpliquées | Contribution des réductions inexpliquées (%) |
|-------------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------|--|
| Acide férulique | 1 | 1,3 | 0,3 | 23 |
| Acide caféique | 2 | 3,6 | 1,6 | 44 |
| Acide gallique | 3 | 5,5 | 2,5 | 45 |
| Acide protocatéchique | 2 | 5,6 | 3,6 | 64 |
| Catéchine | 4 | 6,0 | 2 | 33 |
| Acide 5-caféoylquinique | 2 | 6,1 | 4,1 | 67 |
| Myricétine | 6 (5 +1) | 6,2 | 0,2 | 3 |
| Épicatéchine | 4 | 6,5 | 2,5 | 38 |
| Quercétine | 5 (4 + 1) | 7,5 | 3,5 | 46 |
| Acide rosmarinique | 4 | 8,8 | 4,8 | 54 |

Tableau 3. Stœchiométrie des composés phénoliques analysés avec la méthode DPPH.

Il apparaît sur le **Tableau 3** que les acides protocatéchique et 5-caféoylquinique réalisent près de quatre réductions inexpliquées représentant environ 65 % de leur stœchiométrie finale

réelle. Le cas des flavonoïdes est plus délicat à aborder. En effet, la moindre contribution des réductions inexpliquées par la stœchiométrie de base, de l'ordre de 3, 33, 38, et 46 % pour la myricétine, la catéchine, l'épicatéchine et la quercétine, respectivement, pourrait révéler que l'activité antioxydante globale est majoritairement gouvernée par la stœchiométrie de base. Mais cela pourrait plus vraisemblablement montrer que la prise en compte de tous les hydroxyles phénoliques de la molécule de départ dans la stœchiométrie de base apparente n'a pas de signification chimique. En effet, il est légitime de s'interroger sur la validité de considérer tous les hydroxyles phénoliques comme équivalents en termes de réactivité, alors même qu'il est généralement admis que les hydroxyles phénoliques (en position *méta*) du cycle A ne participent pas à la stœchiométrie finale. Finalement, la valeur des réductions inexpliquées, et nécessairement leurs contributions dans la stœchiométrie finale, sont grandement tributaires des hypothèses que l'on formule a priori concernant la valeur de la stœchiométrie de base. Afin d'éviter ce problème, nous avons restreint l'étude de la nature de ces réductions inexpliquées au cas univoque des acides *o*-diphénoliques (acides caféique, protocatéchique et 5-caféoylquinique).

Classiquement, l'acide *o*-diphénolique va céder son atome hydrogène le plus labile au radical DPPH[•] en formant un radical semi-quinone (**Fig. 59**) qui va se stabiliser par mésomérie. Ce radical semi-quinone va, par la suite, être le nœud initial d'un réseau de réaction que nous diviserons en trois voies réactionnelles¹⁷ potentielles qui toutes permettent d'obtenir une stœchiométrie finale qui excède la stœchiométrie de base. L'idée sous-jacente étant de chercher parmi ces voies réactionnelles celle(s) capable(s) d'expliquer les valeurs expérimentales obtenues.

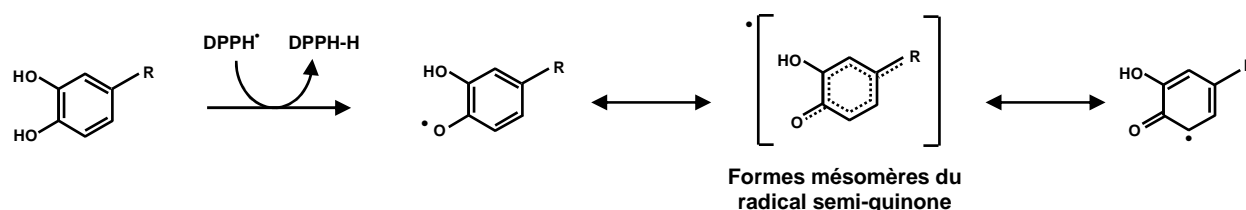


Fig. 59. Formation du radical semi-quinone issu de la cession de l'atome hydrogène le plus labile.

¹⁷ Par commodité, nous avons considéré chaque voie réactionnelle comme étant indépendante des autres ce qui, bien évidemment, est un cas théorique idéal. Il est en effet hautement probable que le mécanisme global de réduction du radical DPPH[•] implique des voies réactionnelles mixtes, comme dans le cas des esters butylique et dodécylique d'acide 5-caféoylquinique qui mettent vraisemblablement en jeu des réactions de dimérisation associées à une régénération par le méthanol (López Giraldo *et al.*, 2009).

(i) La première voie réactionnelle consiste en une réaction d'hétérodimérisation entre le radical semi-quinone et un radical DPPH[•] pour former une « semi-quinone non radicalaire » possédant toujours un hydroxyl phénolique (**Fig. 60**). La « semi-quinone non radicalaire » réduit ensuite un autre radical DPPH[•], se transformant en *o*-quinone radicalaire, qui pourra ensuite être impliquée dans une dimérisation avec un quatrième radical DPPH[•]. Cette voie potentielle d'hétérodimérisation est ici stoppée, l'*o*-quinone relativement stable n'ayant plus de groupement réducteur disponible. Au final, un acide *o*-diphénolique contenant deux hydroxyles phénoliques piège quatre radicaux DPPH[•]. Cette voie réactionnelle permettrait d'expliquer la stœchiométrie finale de 3,6 pour l'acide caféique, mais pas celles des acides gallique et 5-caféoylquinique, ce qui semble infirmer son implication dans l'asymétrie observée.

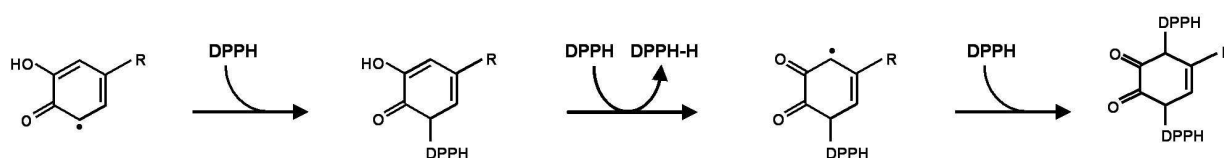


Fig. 60. Voie potentielle d'hétérodimérisation entre deux radicaux DPPH[•] et un radical semi-quinone.

(ii) La deuxième voie réactionnelle potentielle impliquerait le caractère acide des hydrogènes en α des fonctions quinones d'un dimère. Cette voie suppose que les radicaux semi-quinones sont plus aptes à former un dimère par homodimérisation qu'à céder un deuxième hydrogène. Cependant, compte tenu des différentes formes mésomères possibles pour le radical semi-quinone, il peut résulter de nombreux dimères (dix pour l'acide protocatéchique et vingt et un pour les acides 5-caféoylquinique et rosmarinique), ce qui rend pratiquement impossible l'exploration exhaustive de la stœchiométrie possible de ces produits complexes.

(iii) Enfin, la troisième voie réactionnelle potentielle consisterait en une régénération de l'*o*-quinone, en sa forme *o*-diphénol correspondante, par addition nucléophile de méthanol. Par le biais de cette réaction, le radical semi-quinone céderait son deuxième atome hydrogène à un radical DPPH[•], pour former une *o*-quinone. Selon ce scénario, le méthanol (solvant) présent en grand excès serait ensuite capable de régénérer l'*o*-quinone en sa forme *o*-diphénol (**Fig. 61**). Ce mécanisme d'addition nucléophile de méthanol puis de régénération de la structure *o*-diphénol (ou catéchol) pourrait en théorie se répéter jusqu'à l'obtention de la forme polyméthoxylée finale (forme diméthoxylée dans la **Fig. 61**).

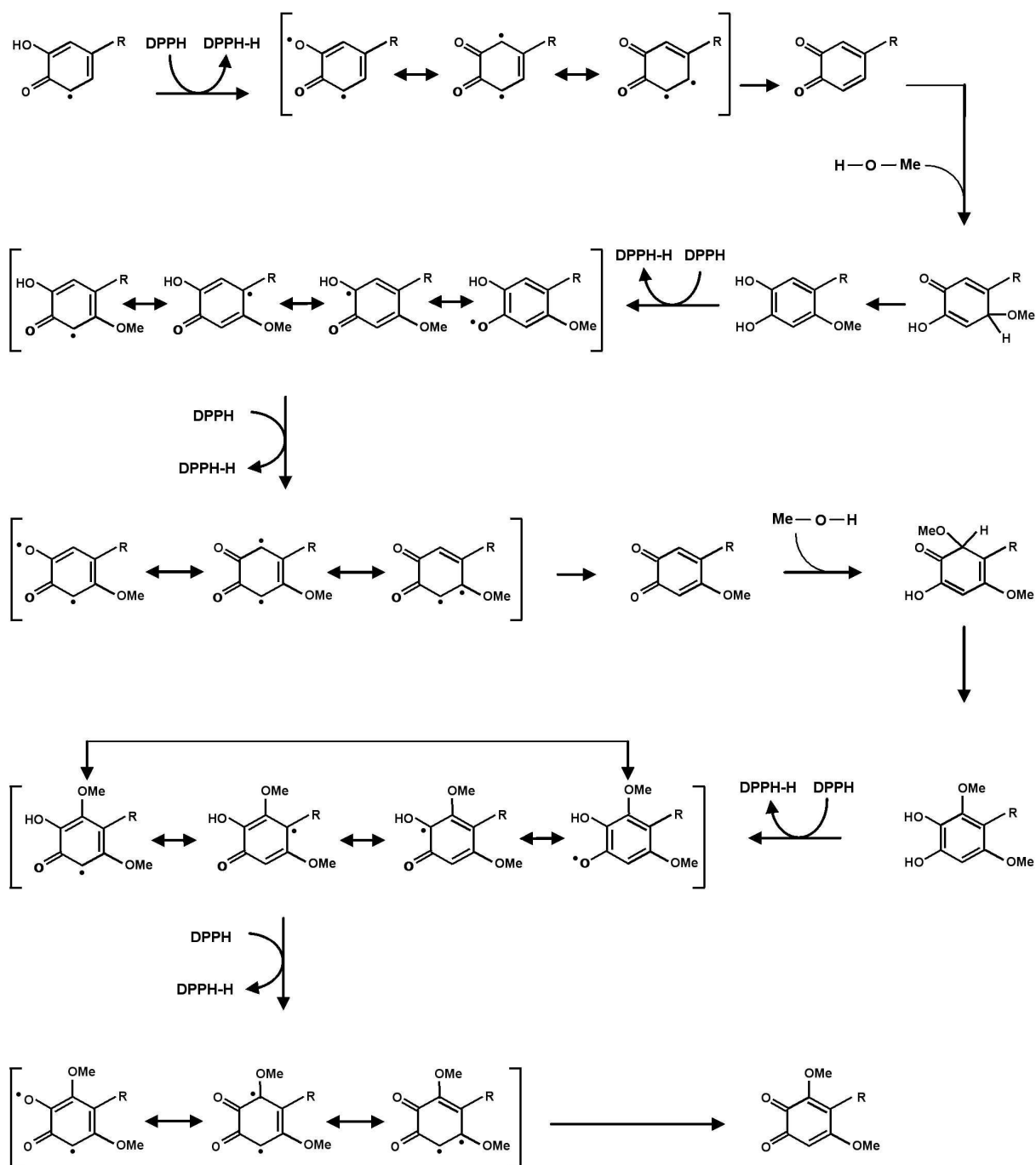


Fig. 61. Voie potentielle de régénération de l'*o*-quinone en *o*-diphénol par addition nucléophile successive de deux molécules de méthanol et réduction de six radicaux DPPH•.

Finalement, par le biais de cette voie réactionnelle potentielle, un acide *o*-diphénolique contenant deux hydroxyles phénoliques peut réduire six radicaux DPPH• par l'intermédiaire de deux régénérations par le méthanol, ce qui pourrait expliquer l'asymétrie observée entre la stœchiométrie de base et la stœchiométrie finale des acides protocatéchique, caféique et 5-caféoylquinique. Plus précisément, la stœchiométrie finale de l'acide caféique impliquerait

une seule attaque nucléophile par le méthanol, tandis que celles des acides protocatéchique et 5-caféoylquinique en impliqueraient deux.

Partageant le même motif caféique, il est toutefois surprenant de constater que les acides caféique et 5-caféoylquinique procèdent par des cinétiques et des stœchiométries différentes. En fait, ce résultat n'est pas isolé, puisque de nombreux auteurs ont observé que les acides exerçaient des activités antiradicalaires envers le radical DPPH[•] significativement plus faibles dans le méthanol comparées à leurs esters. Ceci a notamment été constaté pour des acides carboxyliques comme les acides protocatéchique (Saito *et al.*, 2004) et caféique (Silva *et al.*, 2000 ; Son et Lewis, 2002), mais également pour des acides phosphoniques comme l'acide 3,4-dihydroxyphénylphosphonique (Saito et Kawabata, 2006). Or, il peut être avancé en accord avec les calculs de Saito et Kawabata (2006) relatifs à la densité électronique de l'orbitale moléculaire vide de plus basse énergie (LUMO), que la dissociation éventuelle de l'acide carboxylique de l'acide caféique, diminue l'effet mésomère attracteur du groupe CH=CH-COOH en position 1, par rapport à son ester quinique (acide 5-caféoylquinique) non dissocié (Fig. 62). Ainsi, le cycle serait plus riche en électrons pour l'acide caféique, ce qui diminuerait l'électrophilie des carbones du cycle, et par la même, défavoriserait l'addition nucléophile du méthanol pour régénérer l'*o*-diphénol à partir de l'*o*-quinone.

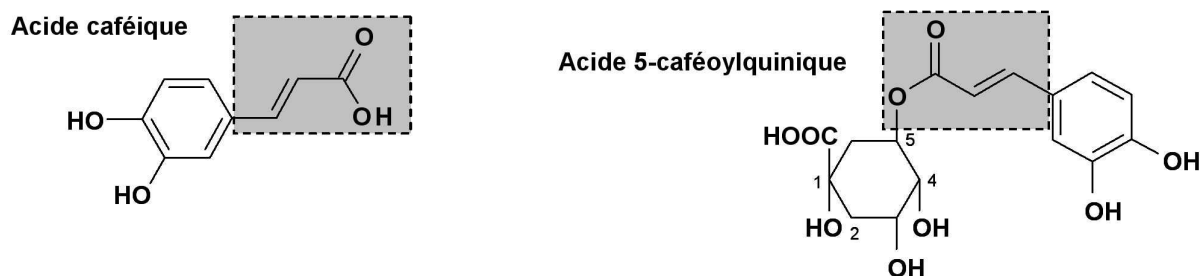


Fig. 62. Structure moléculaire des acides caféique et 5-caféoylquinique. L'insert grisé correspond au groupement à effet mésomère attracteur d'électron.

Cette influence de la dissociation du groupement à effet mésomère attracteur d'électron est d'autant plus probable que le méthanol est un nucléophile relativement faible pour lequel une activation électrophile préalable des atomes de carbone du cycle n'est pas négligeable. De manière intéressante, Saito et Kawabata (2006) ont observé que la cinétique de réduction du radical DPPH[•] pour l'acide protocatéchique atteignait l'état stable beaucoup plus lentement qu'avec son ester méthylique. De manière similaire, nous obtenons le même comportement cinétique différentiel entre l'acide caféique et son ester quinique (Fig. 63), puisque l'acide 5-caféoylquinique (ratio molaire acide/DPPH[•] : 0.2) permet d'atteindre l'état stable en deux à

trois heures, tandis que la réaction entre le DPPH[•] et l'acide caféique (au même ratio molaire) continue bien au-delà de six heures, ce qui nous a d'ailleurs conduit à effectuer des analyses DPPH sur une durée de 12 h pour déterminer l'activité antiradicalaire de l'acide caféique. Puisqu'après les premières minutes, les hydroxyles phénoliques présents dans la molécule de départ ont vraisemblablement cédé leur atome hydrogène aux radicaux DPPH[•], il semble que la décroissance beaucoup plus lente observée dans le cas de l'acide caféique par rapport à son ester quinique (acide 5-caféoylquinique) soit un témoin indirect de sa cinétique de régénération par le méthanol.

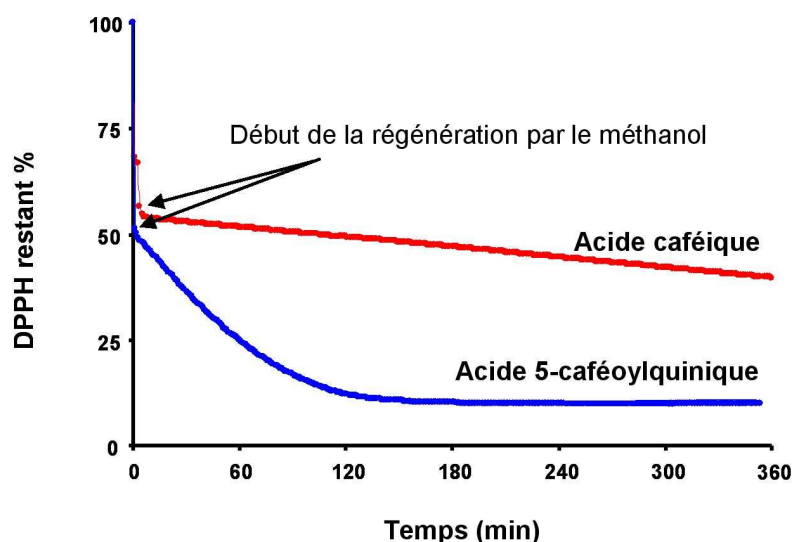


Fig. 63. Cinétiques différentielles de réduction du radical DPPH[•] en présence d'acide caféique et d'acide 5-caféoylquinique.

De plus, [Saito et Kawabata \(2005\)](#) ont observé des différences entre les stœchiométries obtenues après 30 min entre le méthanol et l'acétonitrile pour des dérivés d'acide protocatéchique comme le protocatéchate de méthyle. Ainsi, lorsque les réactions étaient conduites dans l'acétonitrile, la stœchiométrie à 30 minutes (~ 2) était équivalente à la stœchiométrie de base (~ 2), tandis que la même réaction conduite dans le méthanol conduisait à une stœchiométrie de 5 environ. Ce résultat, associé au fait que seule la voie réactionnelle impliquant l'addition nucléophile de méthanol est susceptible d'expliquer la stœchiométrie finale de tous les acides phénoliques testés, milite fortement en faveur de l'implication de cette régénération dans l'asymétrie observée.

Partant de cette hypothèse, il est donc logique de considérer que la contribution des produits d'oxydation (et leur interaction avec le milieu) augmente pour un composé phénolique donné, avec l'augmentation des réductions non expliquées par la stœchiométrie de base. Or, puisque

les durées d'analyses dans la méthodologie DPPH ne sont pas harmonisées, ces processus de régénérations potentiels pourraient expliquer les résultats contradictoires obtenus d'une étude à l'autre pour un même composé. D'autre part, du fait que la nature des produits d'oxydation, est difficile à inférer à partir de la structure de la molécule initiale, cette observation témoigne des limites à prendre en compte lors de l'établissement de la relation structure-activité de composés phénoliques.

2.4. CONCLUSION

Les résultats obtenus nous ont permis d'étudier les déterminants structuraux de l'activité antioxydante de composés phénoliques dans chacun des tests et de mettre en évidence certaines tendances générales. Globalement, il en ressort que l'influence du nombre d'hydroxyles phénoliques ne peut être établi indépendamment de leur position. À cet égard, dans les trois méthodes, l'acide rosmarinique (deux structures catéchols) et la quercétine (une structure catéchol) ont exercé les capacités antioxydantes les plus élevées. Il est ainsi apparu que la structure catéchol jouait un rôle majeur dans le déterminisme des valeurs $ORAC_{FL}$ et CAT, mais semblait, en revanche, peu influente dans l'activité antiradicalaire telle que mesurée dans la méthode DPPH. Ce résultat est probablement à rapprocher de l'absence de compétition entre l'antioxydant et le substrat pour réagir avec les radicaux DPPH[•]. Cela peut également s'expliquer du fait que le mode d'expression des résultats adopté pour la méthode DPPH ne prend pas en compte le temps nécessaire pour que la réaction de réduction des radicaux DPPH[•] par un composé phénolique atteigne un état stationnaire. De ce fait, la stœchiométrie finale obtenue de surcroît dans un système ne mettant pas en jeu un mécanisme compétitif, semble majoritairement gouvernée par un processus de régénération par le méthanol. En revanche, dans les tests $ORAC_{FL}$ et CAT, le radical libre doit être réduit à proximité du substrat de manière rapide ce qui implique une forte réactivité, laquelle semble être majoritairement gouvernée par la structure catéchol.

En parallèle de l'augmentation du nombre de molécules modèles, l'une des perspectives de ce travail pourrait être d'inclure des paramètres cinétiques dans la valeur DPPH, ce qui permettrait d'approfondir la relation existant entre la structure moléculaire et l'activité antioxydante de ces molécules.

3. Application du test CAT à l'étude d'extraits végétaux : feuilles d'olivier

3. APPLICATION DU TEST CAT À L'ÉTUDE D'EXTRAITS VÉGÉTAUX : FEUILLES D'OLIVIER

Depuis plusieurs millénaires, les feuilles d'olivier sont connues pour leurs propriétés curatives. Les anciens égyptiens les utilisaient pour momifier leurs pharaons. Le premier rapport officiel de leur utilisation médicinale a été établi en 1854 et mentionne leurs propriétés antipyrétique et anti-malarienne (Hanbury, 1854). De nos jours, différentes études menées *in vitro* et *in vivo* ont montré les potentialités des extraits de feuilles d'olivier en tant qu'antioxydant (Bouaziz et Sayadi, 2005 ; Benavente-Garcia *et al.*, 2000), anti-HIV (Lee-Huang *et al.*, 2003), vasodilatateur (Zarzuelo *et al.*, 1991) et hypoglycémique (Gonzalez *et al.*, 1992).

La culture de l'olivier, en particulier durant l'élagage, génère un volume considérable de feuilles, la plupart d'entre elles étant détruite pour éviter d'éventuelles infestations dans les oliveraies. Dans ce contexte, les efforts scientifiques portés sur la valorisation de cette biomasse semblent justifiés (Rada *et al.*, 2007). Entre autres applications, la valorisation des propriétés antioxydantes des extraits de feuilles d'olivier semble prometteuse et pourrait, par ailleurs, bénéficier de l'intérêt grandissant pour substituer les antioxydants synthétiques de type BHA et BHT par des extraits naturels.

En termes de composition, les extraits de feuilles d'olivier renferment une pléthore d'antioxydants, de nature phénolique pour la plupart. Dans la seconde moitié du siècle dernier, l'oleuropéine, un composé isolé de l'huile d'olive et des feuilles d'olivier, a été caractérisée comme membre de la famille des sécoiridoïdes (Panizzi *et al.*, 1960). Ce composé, responsable de l'amertume des olives, est un ester d'hydroxytyrosol et d'acide élénolique β -glucosylé (Fig. 64). De nombreux autres sécoiridoïdes structurellement proches de l'oleuropéine, comme le ligstroside et le verbascoside (Fig. 64) ont également été identifiés dans les produits dérivés de la culture de l'olivier. Outre les sécoiridoïdes, notons la présence de nombreux flavonoïdes sous leur forme aglycone (quercétine, diosmétine, lutéoline, apigénine, etc.) ou glycosylée (quercétine-7-O-rutinoside, lutéoline-7-O-rutinoside, lutéoline-7-O-glucoside, lutéoline-5-O-glucoside, etc.) (Fig. 64).

Néanmoins, cette composition varie fortement en fonction de la variété, de la localisation géographique et des conditions agro-climatiques en particulier la saisonnalité. À cet égard, Heimler *et al.* (1996) ont montré que la lutéoline et la lutéoline-7-O-glucoside atteignaient une teneur maximale au printemps, tandis que la lutéoline-4-O-glucoside et l'acide 5-caféoylquinique présentaient un maximum au début de l'hiver. À l'opposé, la teneur d'autres composés, comme la quercitrine et l'apigénine, ne semble pas fluctuer selon la

saison. En relation avec ces résultats, [Fabbri *et al.* \(2008\)](#) ont récemment observé de larges variations de composition en fonction du cultivar et de la saison de collecte. Ainsi, une teneur maximale en polyphénols et sécoiridoïdes fut atteinte en décembre, notamment pour l'oleuropéine. Cependant, en marge de l'étude de ces variations, peu de données disponibles concernent les variations du profil chimique durant le vieillissement des feuilles et leur éventuel impact en termes d'activité antioxydante. L'une des plus grandes difficultés dans ce domaine revient à disposer de méthodes de mesure de l'activité antioxydante adaptées aux extraits végétaux et conduisant à des résultats exploitables dans leur domaine d'application.

Dans le but d'appliquer la méthode CAT à l'étude d'extraits végétaux naturels, nous nous sommes focalisés sur les feuilles d'olivier, qui constituent un cas d'étude intéressant en raison de la diversité des espèces antioxydantes qu'elles renferment. Après une première partie consacrée à la caractérisation et à l'étude de l'évolution du profil chimique des feuilles d'olivier par spectrométrie de masse, nous examinerons leurs propriétés antioxydantes par la méthode CAT.

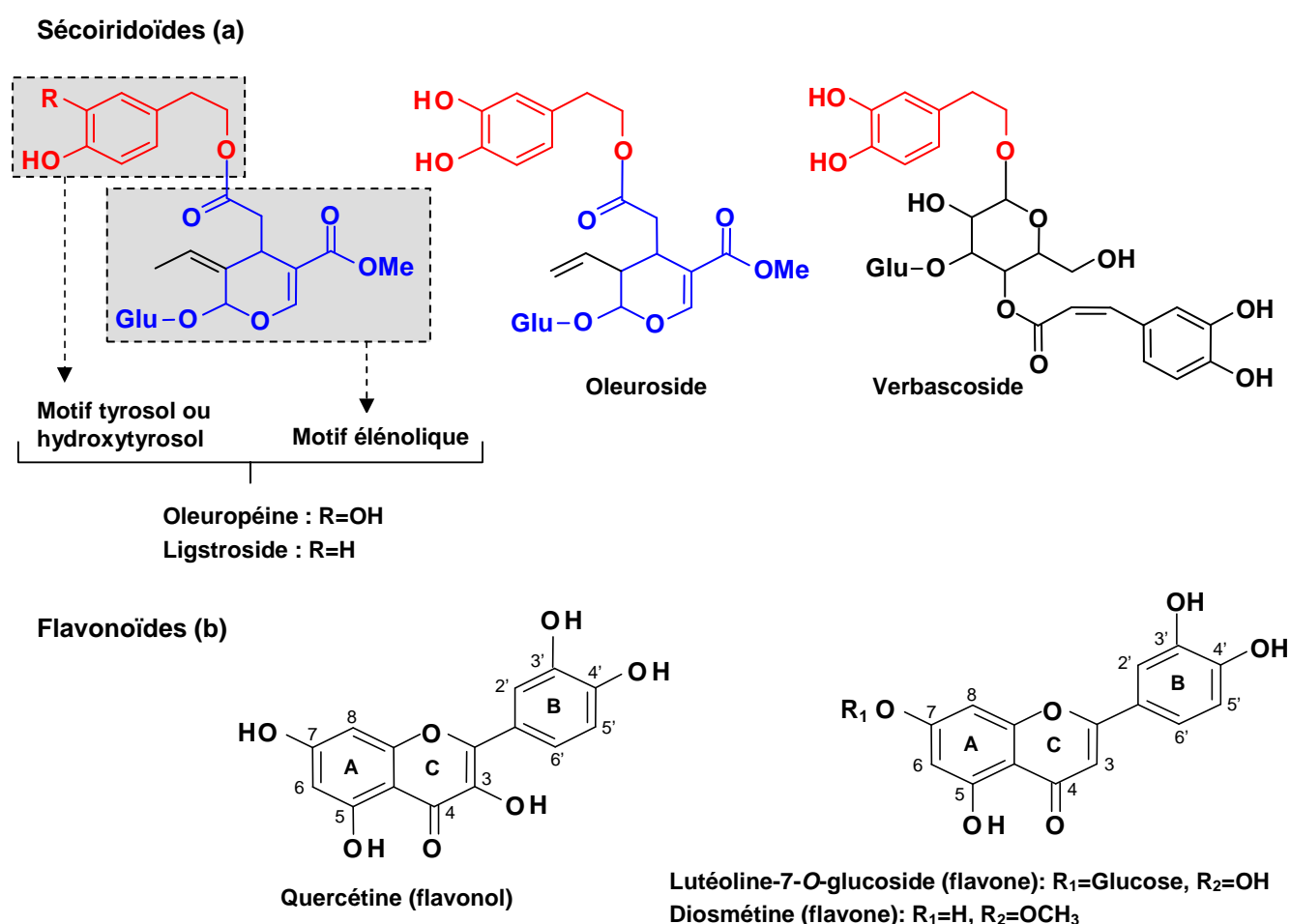


Fig. 64. Composés phénoliques présents dans les feuilles d'olivier.

3.1. CARACTÉRISATION DU PROFIL PHÉNOLIQUE

La caractérisation du profil phénolique des extraits de feuilles d'olivier représente un préalable nécessaire à l'étude de leurs propriétés antioxydantes. Dans ce but, le principe des extractions en cascade que nous avons mis en œuvre (**Fig. 31**) permet d'explorer une large gamme de molécules.

La caractérisation par spectrométrie de masse à ionisation de type électronébulisation en mode négatif couplée à la chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC/MS-ESI) a été réalisée sur les extraits au dichlorométhane (**Fig. 65**), à l'acétate d'éthyle (**Fig. 66**) et au méthanol (**Fig. 67**) de feuilles d'olivier jeunes et âgées. En complément des chromatogrammes, les **Tableaux 4, 5 et 6** donnent la liste des composés phénoliques identifiés dans l'ordre d'élution pour chaque solvant d'extraction. Brièvement, l'identification des composés phénoliques a été basée sur la recherche de l'ion pseudo-moléculaire $[M-H]^-$ (obtenu en mode balayage ou SM) et l'interprétation des ions issus de la fragmentation de l'ion pseudo-moléculaire (obtenu en mode SM^2). Lorsque des composés standards ont été disponibles, l'identification a été effectuée par comparaison de leur temps de rétention et de leur spectre de masse avec les extraits.

Dans un premier temps, les analyses HPLC/MS-ESI réalisées sur les extraits au dichlorométhane ont montré un profil phénolique simple. Les spectres de masse, obtenus en mode balayage et SM^2 , des deux premiers pics détectés à ~ 67,2 min (**A1**) et ~ 68,1 min (**A2**) montrent tous deux un ion pseudo-moléculaire de 539 m/z et un ion dérivé de 377 m/z. L'ion précurseur (539 m/z) semble correspondre à l'ion pseudo-moléculaire de l'oleuropéine et de son isomère, l'oleuroside (**Fig. 65**), dont la masse moléculaire est de 540 g/mol. L'ion de 377 m/z obtenu par fragmentation de l'ion pseudo-moléculaire, correspond à l'aglycone d'oleuropéine ou d'oleuroside et résulte de la perte d'un motif glucose. D'autres expériences ont montré que le pic **A1** était superposable au standard d'oleuropéine, permettant d'associer l'oleuropéine à ce pic et l'oleuroside au pic **A2**. Le troisième pic détecté à ~ 69,4 min (**A3**) est un analogue désoxy d'oleuropéine, appelé ligstroside (**Fig. 65**). Sa présence dans ces extraits est fondée sur l'identification d'une paire d'ions de 523/361 m/z, différant uniquement de ceux de l'oleuropéine (539/377 m/z) par un décalage de 16 unités de masse atomique.

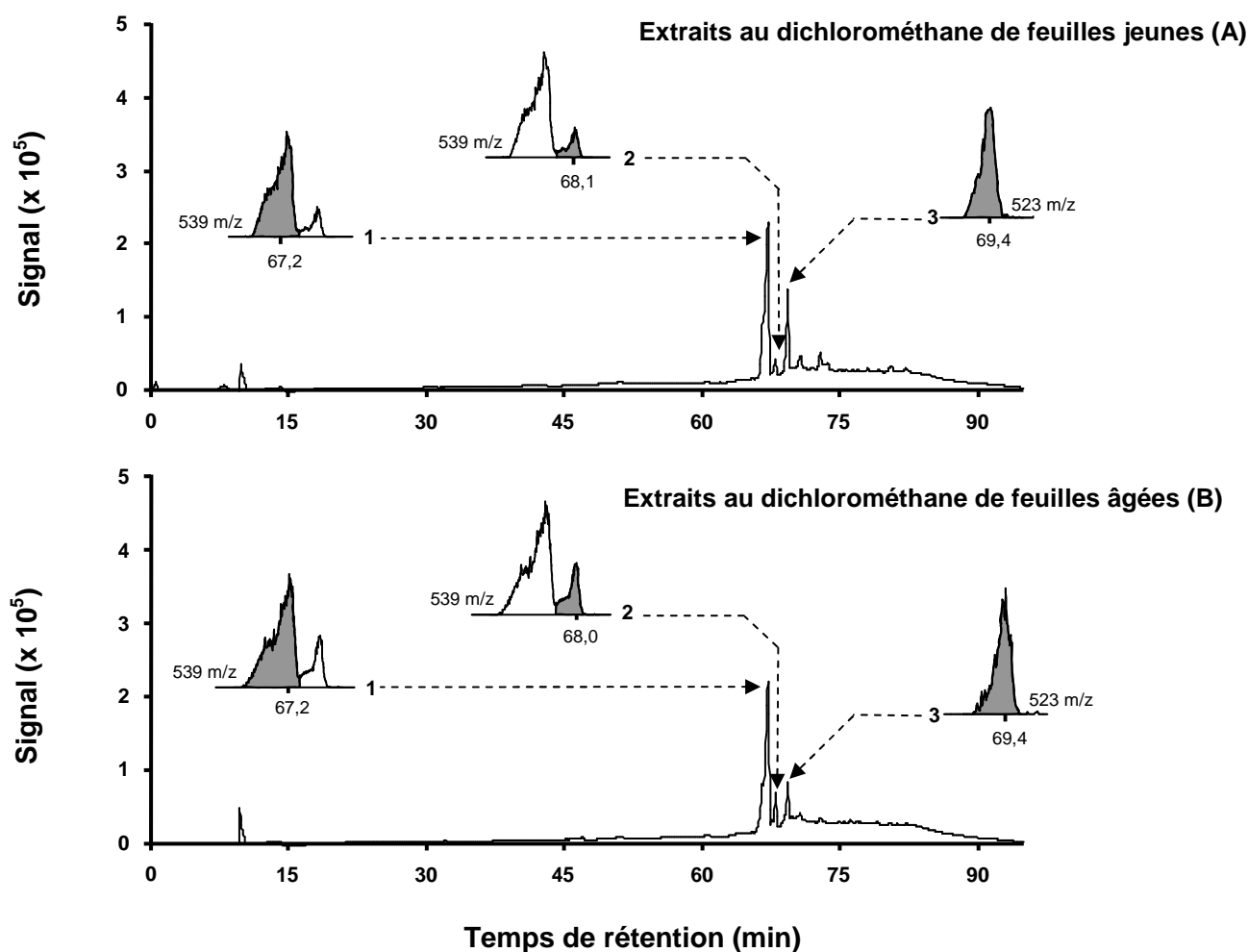


Fig. 65. Chromatogrammes reconstruits à partir des spectres UV (200-700 nm) des extraits au dichlorométhane de feuilles jeunes (A) et âgées (B). Les pics grisés (en insert) correspondent aux ions pseudo-moléculaires extraits des chromatogrammes reconstruits à partir des spectres de masse en mode balayage. Les extraits ont été solubilisés dans le méthanol à 4 mg/mL et 20 μ L ont été injectés. La numérotation des pics correspond à celle donnée dans le **Tableau 4**.

| Composé | Pic | MM | SM [M-H] ⁻ (m/z) | SM ² (m/z) | Feuilles jeunes | Feuilles âgées |
|-------------|-----|-----|--------------------------------|--------------------------|-----------------|----------------|
| | | | | | TR (min) | TR (min) |
| Oleuropéine | A1 | 540 | 539 | 377 | 67,2 | 67,2 |
| Oleuroside | A2 | 540 | 539 | 377 | 68,1 | 68,0 |
| Ligstroside | A3 | 524 | 523 | 361 | 69,4 | 69,4 |

MM : Masse moléculaire

SM [M-H]⁻ : ion pseudo-moléculaire obtenu par spectrométrie de masse à ionisation de type électro-nébulisation en mode balayage (mode SM)

SM² : ion dérivé de la fragmentation (mode SM²) de l'ion pseudo-moléculaire

TR : Temps de rétention

Tableau 4. Liste des composés phénoliques détectés dans les extraits au dichlorométhane de feuilles jeunes et âgées. La numérotation des pics correspond à celle donnée sur la **Fig. 65**.

Concernant les extraits à l'acétate d'éthyle, 10 composés ont été identifiés dans les feuilles jeunes et âgées. Dans un premier temps, les pics **B1** et **B2** détectés à ~ 55,8 min et ~ 56,7 min (exclusivement présents en quantités notables dans les extraits de feuilles âgées) correspondent à deux formes isomères de verbascoside. En effet, leur spectre de masse obtenu en mode balayage montre un ion de 623 m/z, correspondant à l'ion pseudo-moléculaire $[M-H]^-$ du verbascoside qui est un ester hétérosidique d'acide caféique et d'hydroxytyrosol (**Fig. 66**). De même, des pics apparaissant à ~ 57,8 (**B3**) min et ~ 64,2 (**B4**) min font tous deux apparaître un ion précurseur de 447 m/z, correspondant à l'ion pseudo-moléculaire $[M-H]^-$ de la lutéoline-7-*O*-glucoside. L'analyse en mode SM^2 de ces ions a montré pour chacun, un fragment dérivé de 285 m/z, correspondant à la lutéoline aglycone formée par la perte d'un motif glucose. En outre, le pic **B3** est superposable à celui du standard de lutéoline-7-*O*-glucoside. Par la suite, les trois pics apparaissant à ~ 67,3 min (**B5**), ~ 68,1 min (**B6**) et ~ 69,5 min (**B7**) correspondent respectivement à l'oleuropéine, à l'oleuroside et au ligstroside, car ils présentent des SM, SM^2 et temps de rétention identiques aux pics **A1**, **A2** et **A3** préalablement identifiés dans les extraits au dichlorométhane. Le pic **B8** détecté quant à lui à ~ 71 min correspond à l'aglycone de quercétine avec un ion de 301 m/z correspondant à l'ion pseudo-moléculaire $[M-H]^-$ de l'aglycone de quercétine. Enfin, les deux pics détectés à ~ 72,1 min (**B9**) et ~ 73,3 min (**B10**) ont été identifiés comme étant des formes isomères d'aglycone de diosmétine, en raison de leur ion de 299 m/z, correspondant à l'ion pseudo-moléculaire $[M-H]^-$ de l'aglycone de diosmétine.

| Composé | Pic | MM | SM $[M-H]^-$ (m/z) | SM^2 (m/z) | Feuilles jeunes | Feuilles âgées |
|----------------------------------|-----|-----|-----------------------|-----------------|-----------------|----------------|
| | | | | | TR (min) | TR (min) |
| Verbascoside (isomère 1) | B1 | 624 | 623 | - | 55,8 (trace) | 55,8 |
| Verbascoside (isomère 2) | B2 | 624 | 623 | - | 56,7 (trace) | 56,8 |
| Lutéoline-7- <i>O</i> -glucoside | B3 | 448 | 447 | 285 | 57,8 | 58,0 |
| Lutéoline-glucoside isomère | B4 | 448 | 447 | 285 | 64,2 | 64,4 |
| Oleuropéine | B5 | 540 | 539 | 377 | 67,3 | 67,3 |
| Oleuroside | B6 | 540 | 539 | 377 | 68,1 | 68,1 |
| Ligstroside | B7 | 524 | 523 | 361 | 69,5 | 69,4 |
| Quercétine | B8 | 302 | 301 | - | 71,0 | 70,9 |
| Diosmétine aglycone (isomère 1) | B9 | 300 | 299 | - | 72,1 | 72,2 |
| Diosmétine aglycone (isomère 2) | B10 | 300 | 299 | - | 73,3 | 73,4 |

MM : Masse moléculaire

SM $[M-H]^-$: ion pseudo-moléculaire obtenu par spectrométrie de masse à ionisation de type électronébulisation en mode balayage (mode SM)

SM^2 : ion dérivé de la fragmentation (mode SM^2) de l'ion pseudo-moléculaire

TR : Temps de rétention

Tableau 5. Liste des composés phénoliques détectés dans les extraits à l'acétate d'éthyle de feuilles jeunes et âgées. La numérotation des pics correspond à celle donnée sur la **Fig. 66**.

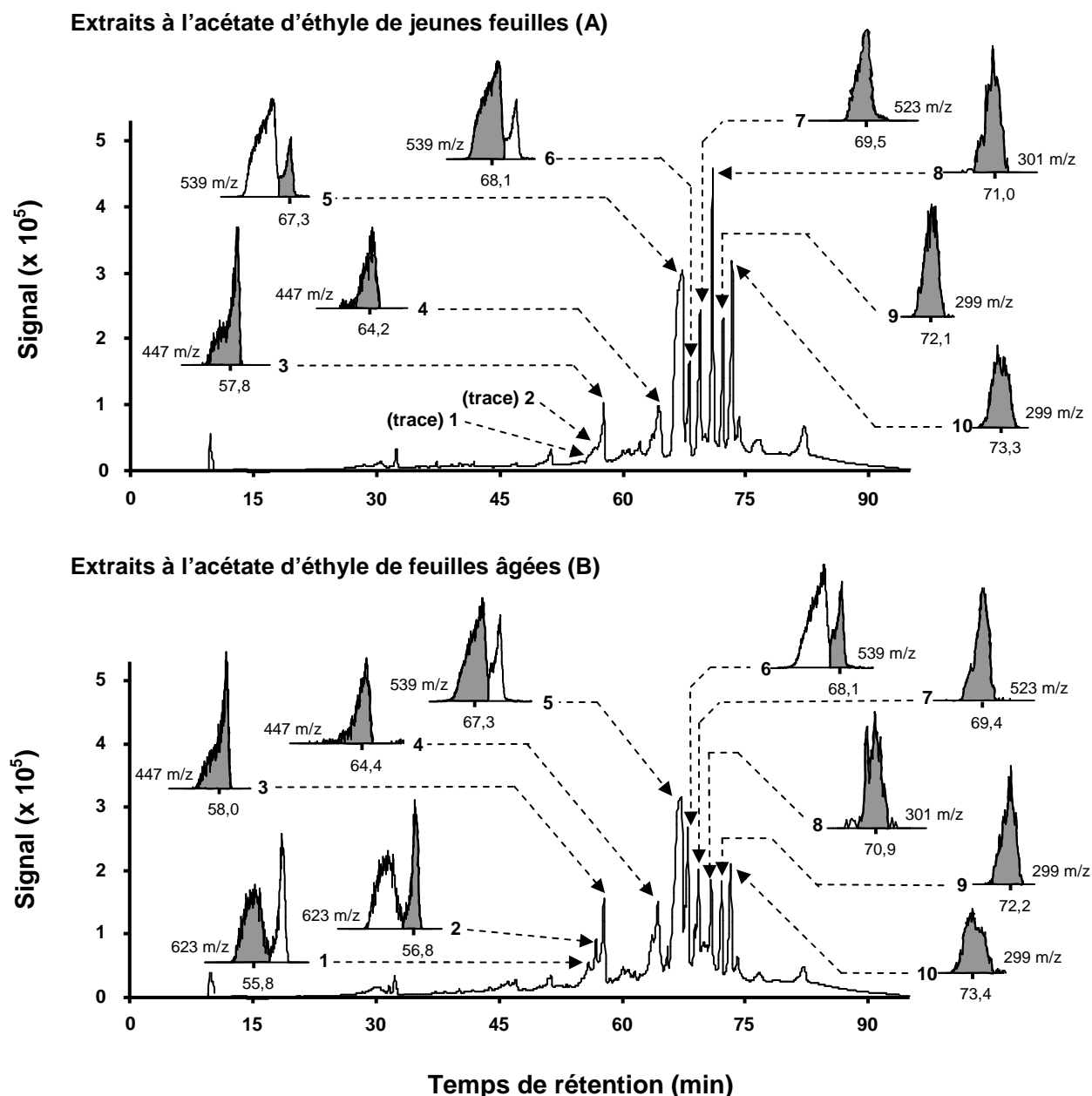


Fig. 66. Chromatogrammes reconstruits à partir des spectres UV (200-700 nm) des extraits à l'acétate d'éthyle de feuilles jeunes (A) et âgées (B). Les pics grisés (en insert) correspondent aux ions pseudo-moléculaires extraits des chromatogrammes reconstruits à partir des spectres de masse en mode full scan. Les extraits ont été solubilisés dans le méthanol à 4 mg/mL et 20 μ L ont été injecté. La numérotation des pics correspond à celle donnée dans le **Tableau 5**.

Finalement, les extraits méthanoliques de feuilles jeunes et âgées présentent les mêmes composés que ceux précédemment observés dans les extraits à l'acétate d'éthyle. Par analogie, nous avons identifié deux formes isomères de verbascoside (**C1**, et **C2**, exclusivement présents dans les extraits de vieilles feuilles) à ~ 55,6 min et ~ 56,7 min, de la lutéoline-7-*O*-glucoside (**C3**) à ~ 57,8 min, une forme isomère non identifiée de lutéoline-glucoside (**C4**) à ~ 64,4 min, de l'oleuropéine (**C5**) à ~ 67,1 min, de l'oleuroside (**C6**) à

~ 68 min, du ligstroside (**C7**) à ~ 69,5 min, de la quercétine (**C8**) à ~ 70,8 min, ainsi que deux formes isomères d'aglycone de diosmétine (**C9,10**) à ~ 72,2 min et ~ 73,2 min (**Fig. 67** ; **Tableau 6**).

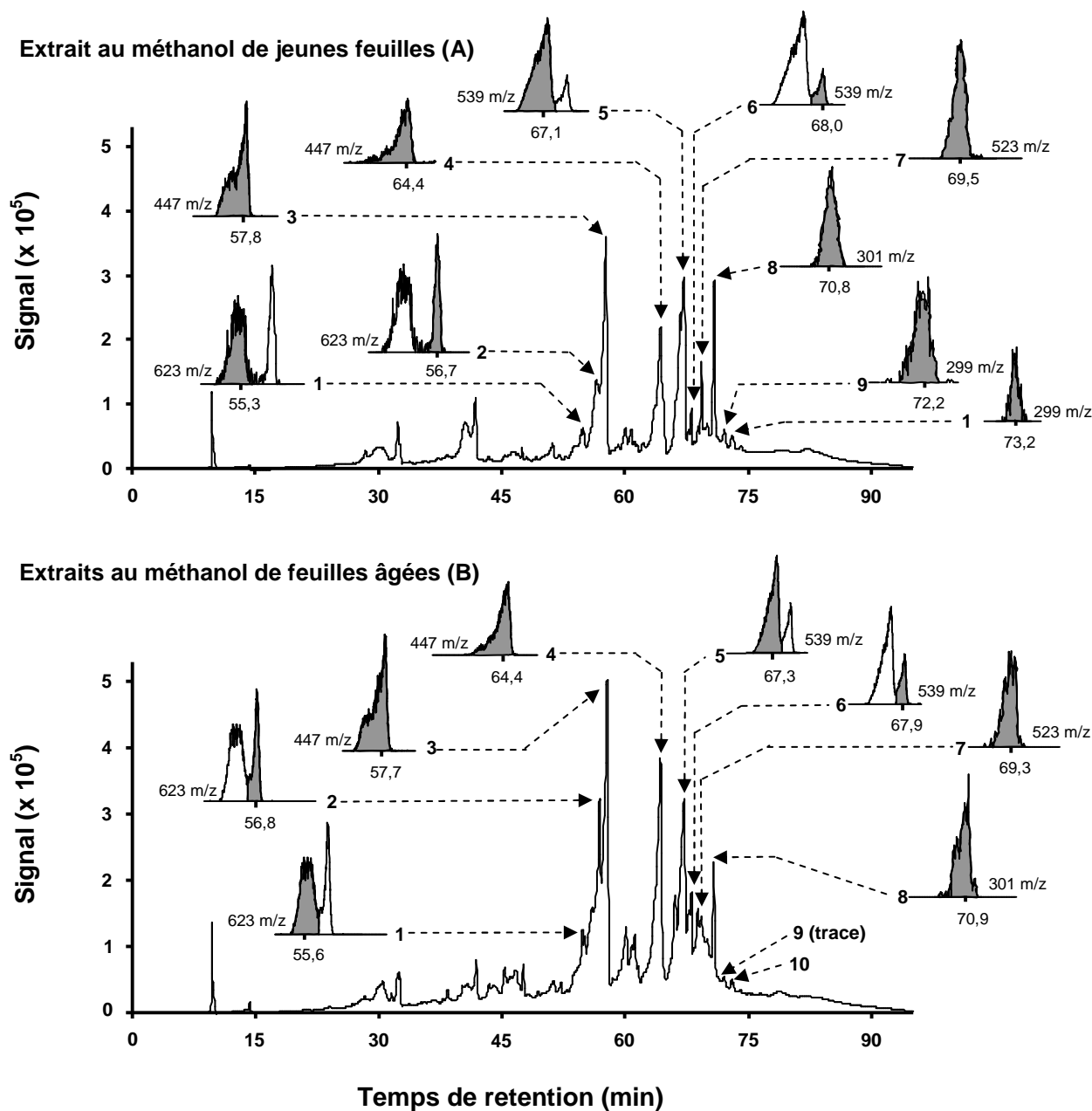


Fig. 67. Chromatogrammes reconstruits à partir des spectres UV (200-700 nm) des extraits au méthanol de feuilles jeunes (A) et âgées (B). Les pics grisés (en insert) correspondent aux ions pseudo-moléculaires extraits des chromatogrammes reconstruits à partir des spectres de masse en mode balayage. Les extraits ont été solubilisés dans le méthanol à 4 mg/mL et 20 μ L ont été injectés. La numérotation des pics correspond à celle donnée dans le **Tableau 6**.

| Composé | Pic | MM | SM [M-H] ⁻ (m/z) | SM ² (m/z) | Feuilles jeunes | Feuilles âgées |
|----------------------------------|-----|-----|--------------------------------|--------------------------|-----------------|----------------|
| | | | | | TR (min) | TR (min) |
| Verbascoside (isomère 1) | C1 | 624 | 623 | - | 55,3 | 55,6 |
| Verbascoside (isomère 2) | C2 | 624 | 623 | - | 56,7 | 56,8 |
| Lutéoline-7- <i>O</i> -glucoside | C3 | 448 | 447 | 285 | 57,8 | 57,7 |
| Lutéoline-glucoside isomère | C4 | 448 | 447 | 285 | 64,4 | 64,4 |
| Oleuropéine | C5 | 540 | 539 | 377 | 67,1 | 67,3 |
| Oleuroside | C6 | 540 | 539 | 371 | 68,0 | 67,9 |
| Ligstroside | C7 | 524 | 523 | 361 | 69,5 | 69,3 |
| Quercétine | C8 | 302 | 301 | - | 70,8 | 70,9 |
| Diosmétine aglycone (isomère 1) | C9 | 300 | 299 | - | 72,2 | 72,1 (trace) |
| Diosmétine aglycone (isomère 2) | C10 | 300 | 299 | - | 73,2 | 73,2 (trace) |

MM : Masse moléculaire

SM [M-H]⁻ : ion pseudo-moléculaire obtenu par spectrométrie de masse à ionisation de type électronébulisation en mode balayage (mode SM)

SM² : ion dérivé de la fragmentation (mode SM²) de l'ion pseudo-moléculaire

TR : Temps de rétention

Tableau 6. Liste des composés phénoliques détectés dans les extraits au méthanol de feuilles jeunes et âgées. La numérotation des pics correspond à celle donnée sur la **Fig. 67**.

3.2. ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION DU PROFIL PHÉNOLIQUE

Dans un premier temps, la mauvaise résolution des pics apparaissant sur les chromatogrammes reconstruits à partir du spectre PDA (en particulier pour les extraits au méthanol) rend difficile leur intégration. Afin d'obtenir une résolution satisfaisante, nous avons extrait du chromatogramme reconstruit à partir des spectres de masse (en mode balayage) les ions pseudo-moléculaires [M-H]⁻ des composés phénoliques précédemment identifiés (**inserts des Figs. 65, 66 et 67**). À partir de ces profils de masse, l'aire des pics a pu être intégrée de manière satisfaisante, comme en témoigne la qualité de séparation obtenue pour chaque pic. Bien évidemment, il est à noter que ce procédé ne permet pas de comparer des molécules de nature différente, puisque les facteurs de réponse et les conditions d'ionisation ne sont pas les mêmes d'un composé à l'autre. En revanche, ce procédé permet d'étudier l'évolution d'un composé donné dans différents extraits. Par conséquent, la composition relative de composé analysé dans les différents extraits a été exprimée comme le pourcentage de la teneur maximale dans les extraits considérés. À titre d'exemple, la teneur en oleuropéine dans les extraits à l'acétate d'éthyle de jeunes feuilles a été considérée comme la teneur maximale (100 %) en comparaison de laquelle les compositions relatives en oleuropéines des autres extraits ont été établies. L'application de ce procédé semi-quantitatif pour chaque composé a permis d'obtenir les **Figs. 68** (cas des sécoiridoïdes) et **69** (cas des

flavonoïdes), ce qui rend possible l'étude de la composition relative en composés phénoliques en fonction du degré de vieillissement des feuilles d'olivier. Notons que les extraits obtenus par extraction en cascade ne se prêtent pas à l'étude de l'influence du solvant d'extraction utilisé. D'autre part, puisque les deux formes isomères de verbascoside suivent la même évolution, leurs aires de pics ont été sommées pour générer une composition relative commune (**Fig. 68 a**). Par commodité, ce mode de calcul a également été employé avec les deux formes glucosylées de lutéoline (**Fig. 69 a**), ainsi que les deux isomères de diosmétine (**Fig. 69 c**).

Dans un premier temps, il est apparu que les extractions en cascade génèrent des redondances dans tous les extraits pour l'oleuropéine, l'oleuroside et le ligstroside, ce qui suggère que ces composés sont largement distribués dans les tissus des feuilles d'olivier. Outre ces trois molécules, d'autres composés comme les formes isomères de verbascoside, les glucosides de lutéoline, la quercétine et les isomères d'aglycone de diosmétine, apparaissent lorsque la fraction insoluble résultant de l'extraction au dichlorométhane est soumise à l'extraction par des solvants plus polaires, en l'occurrence, l'acétate d'éthyle puis le méthanol. Les extraits ainsi obtenus présentent un profil chimique plus complexe que celui obtenu pour le dichlorométhane.

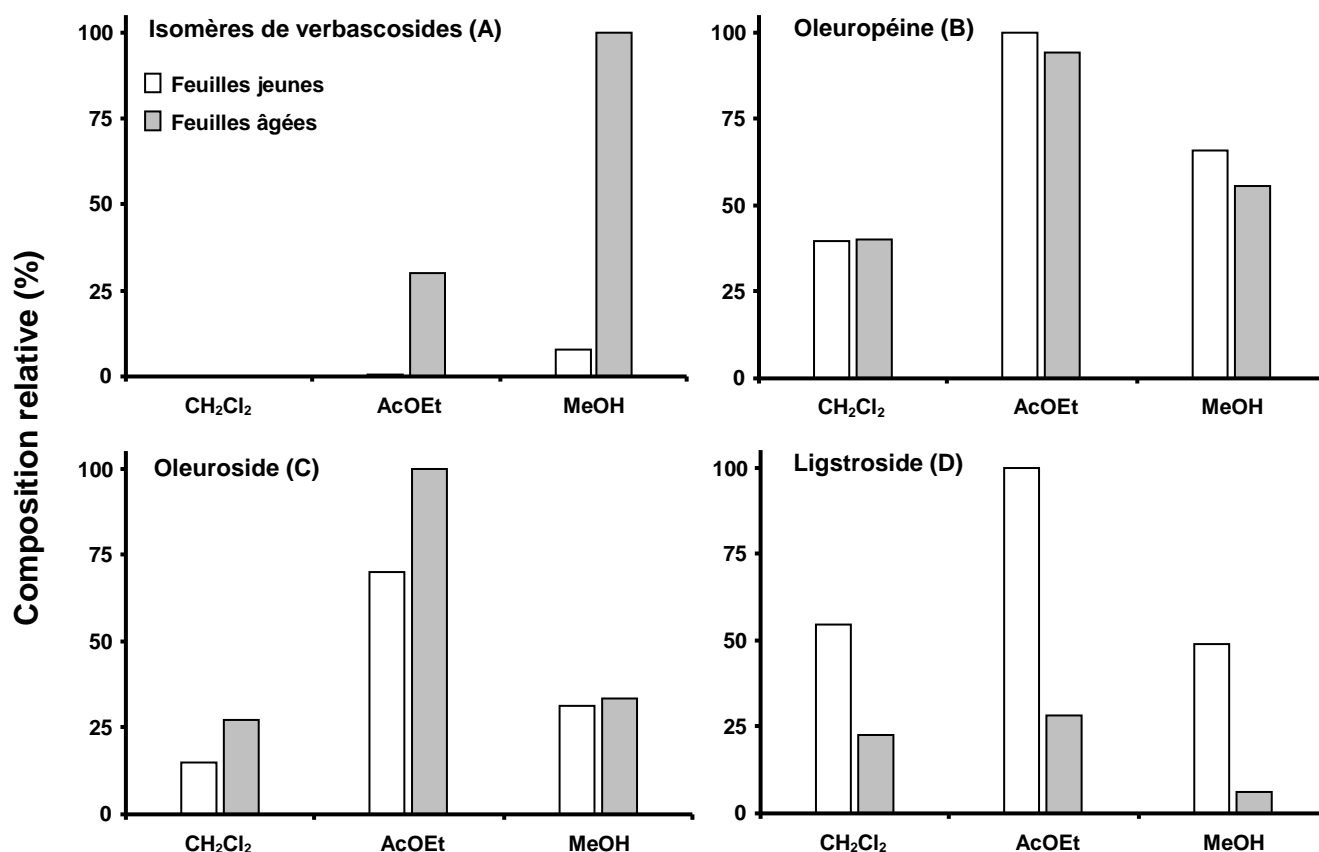


Fig. 68. Composition relative en sécoiridoïdes présents dans les extraits au dichlorométhane (CH₂Cl₂), à l'acétate d'éthyle (AcOEt) et au méthanol (MeOH) de feuilles d'olivier. La composition relative d'un composé donné a été exprimée par rapport à la teneur maximale (100 %) de ce composé rencontrée dans les différents extraits.

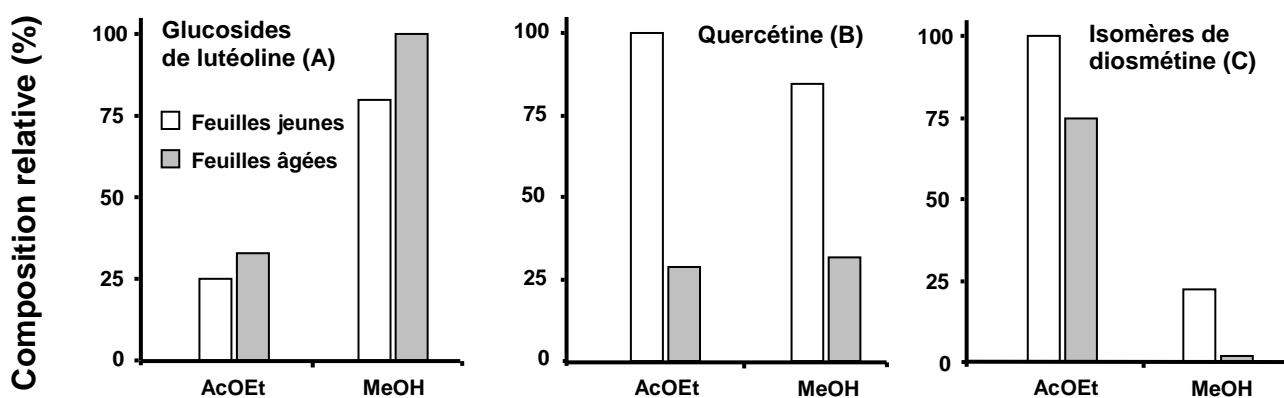


Fig. 69. Composition relative en flavonoïdes présents dans les extraits à l'acétate d'éthyle (AcOEt) et au méthanol (MeOH) de feuilles d'olivier. La composition relative d'un composé donné a été exprimée par rapport à la teneur maximale (100 %) de ce composé rencontrée dans les différents extraits.

Quel que soit le solvant d'extraction employé, il est apparu que le vieillissement des feuilles d'olivier s'accompagnait d'une diminution de la teneur en oleuropéine (exception faite des extraits au dichlorométhane), ligstroside, quercétine et diosmétine, avec une augmentation concomitante de l'oleuroside, du verbascoside et des glucosides de lutéoline (**Figs 68, 69**). À notre connaissance, il existe très peu de données disponibles portant sur l'influence du vieillissement des feuilles d'olivier sur leur profil phénolique. Néanmoins, un parallèle peut être établi avec d'autres organes de l'olivier comme les fruits notamment. Il est en effet intéressant de noter qu'[Amiot *et al.* \(1986\)](#) ont établi une relation inverse entre la teneur en oleuropéine et celle en verbascoside dans l'olive et ont, par ailleurs, montré que ce dernier ne pouvait être détecté dans les jeunes olives. Tenant compte du fait que le verbascoside et l'oleuropéine partagent le même motif hydroxytyrosol (**Fig. 64**) [Amiot *et al.* \(1986\)](#) ont postulé l'existence d'une relation métabolique entre l'oleuropéine et le verbascoside. Par conséquent, il est tentant d'avancer l'hypothèse que la même bioconversion de l'oleuropéine en verbascoside peut également avoir lieu durant le vieillissement des feuilles d'olivier. De plus, à l'instar des isomères de verbascoside, la teneur en oleuroside augmente de manière concomitante à la diminution des teneurs en oleuropéine et ligstroside. Puisque ces quatre sécoiridoïdes sont structurellement proches, il est vraisemblable que la bioconversion de l'oleuropéine et/ou du ligstroside en oleuroside et/ou verbascoside a lieu durant le vieillissement. Afin de vérifier que l'oleuroside et le verbascoside ne provenaient pas du métabolisme d'autres composés renfermant une telle structure, une recherche du tyrosol et de l'hydroxytyrosol a été effectuée dans nos extraits. Pour ce faire, l'extraction de leurs ions pseudo-moléculaires $[M-H]^-$ a été réalisée sur les chromatogrammes reconstruits à partir des spectres de masse acquis en mode balayage. Or, aucun signal significatif n'a été détecté. L'absence de ces produits d'hydrolyse des sécoiridoïdes n'est pas surprenante, en particulier pour l'hydroxytyrosol qui est souvent présent dans la nature sous sa forme glycosylée ([De Leonardis *et al.*, 2008](#)). En outre, ce résultat renforce quelque peu notre hypothèse selon laquelle l'oleuropéine et le ligstroside sont les seules molécules possédant un motif hydroxytyrosol (ou tyrosol dans le cas du ligstroside) nécessaire à la formation de l'oleuroside et des isomères de verbascoside.

Outre cette évolution du profil sécoiridoïdique, nous avons également observé que la diminution de la teneur en aglycones de flavonoïdes (quercétine et diosmétine) s'accompagnait d'une augmentation des teneurs en glucosides de lutéoline (**Fig. 69**). En fait, il est bien connu que les aglycones de flavonoïdes qui présentent de nombreux sites de glycosylation, sont convertis en glycosides par les glycosyltransferases au cours des dernières

étapes de la biosynthèse des flavonoïdes (Kim *et al.*, 2006). En accord avec nos données chromatographiques, les flavonoïdes sont probablement stockés dans les feuilles âgées sous leur forme glycosylée, qui est censée les protéger des processus de dégradation, mais surtout, de réduire leur toxicité pour la plante (Jones et Vogt, 2001). Par conséquent, en parallèle de la bioconversion des sécoiridoïdes, une transformation des aglycones de quercétine et de diosmétine en glucosides de lutéoline pourrait également avoir lieu durant le vieillissement. À ce propos, il est utile de préciser que la glycosylation n'est pas le seul processus chimique nécessaire à ce type de bioconversion. En effet, l'addition d'un groupe 4'-hydroxy- sur le cycle B de la diosmétine (remplaçant le groupe méthoxyle), conjointement à l'élimination du groupement 3-hydroxy- sur l'hétérocycle C de la quercétine constitue des étapes importantes de ce schéma potentiel de transformation biochimique.

3.3. ÉTUDE DE LA CAPACITÉ ANTIOXYDANTE DES EXTRAITS DE FEUILLES

La capacité antioxydante des extraits de feuilles d'olivier a été évaluée par la méthode CAT selon les mêmes conditions que celles décrites précédemment pour les composés phénoliques purs (sections 3.1. et 3.2.). La **Fig. 70** illustre la cinétique de la chute d'absorbance relative à 273 nm en absence ou en présence d'extraits de feuilles d'olivier (équivalents pondéraux).

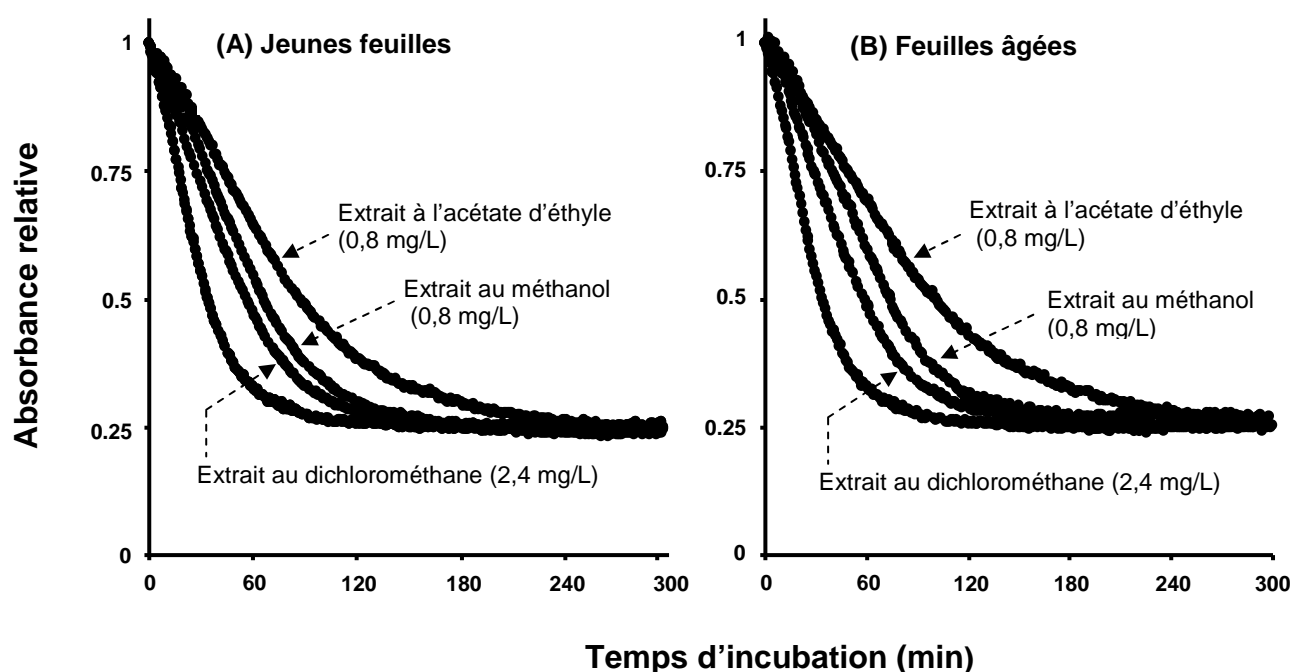


Fig. 70. Cinétiques de chute d'absorbance à 273 nm en absence ou en présence d'extraits de feuilles jeunes (A) et âgées (B) en émulsion d'huile de tung purifiée. Le milieu réactionnel final contient 115 µM d'huile de tung, 17 µM de Brij 35, 1 mM d'AAPH et 0,8 à 2,4 mg/L d'extraits, dans le PBS (pH 7,2) à 37°C.

Il est apparu que tous les extraits permettaient de retarder l'oxydation de l'huile de tung induite par 1 mM d'AAPH. La **Fig. 70** ainsi obtenue, montre clairement que les extraits testés n'induisaient pas de phase de latence significative, ce qui permet de renseigner, au moins en partie, leur mécanisme d'action. Ainsi, les extraits de feuilles d'olivier semblent davantage capables de piéger les radicaux dérivés de l'AAPH plutôt que les peroxyradicaux lipidiques dérivés de l'huile de tung. En effet, nous avons préalablement postulé (section 3.1.) en accord avec Goupy *et al.* (2007) que l'absence de phase de latence était caractéristique d'un piégeage des peroxyradicaux initiateurs dérivés de l'AAPH. Ceci est probablement à mettre en relation avec la nature relativement hydrophile des composés phénoliques testés, lesquels sont potentiellement éloignés des gouttelettes d'huile, à l'interface (ou à l'intérieur) desquels a lieu la propagation radicalaire en chaîne de l'oxydation.

Par ailleurs, afin de pouvoir comparer les valeurs CAT des feuilles d'olivier avec des activités antioxydantes établies au moyen d'autres méthodologies, le Trolox a été utilisé comme antioxydant de référence. Ainsi, cet antioxydant de référence a été analysé sur la même microplaque (calibrage interne) à quatre concentrations différentes (0,4; 0,8; 1,2 et 1,6 μM , concentrations finales, données non présentées). Puisque les feuilles d'olivier et plus particulièrement les extraits au dichlorométhane renferment de grandes quantités de chlorophylle (**Fig. 3**), qui est un puissant chromophore, l'augmentation des concentrations des extraits s'est accompagnée d'interférences spectrales dans le domaine ultraviolet. Tenant compte de ce parasitage, la valeur CAT (**Fig. 71**) a été établie à partir des plus faibles concentrations testées (i.e. 2,4 mg/L pour les extraits au dichlorométhane, 0,8 mg/L pour les deux autres), en utilisant l'équation 5.

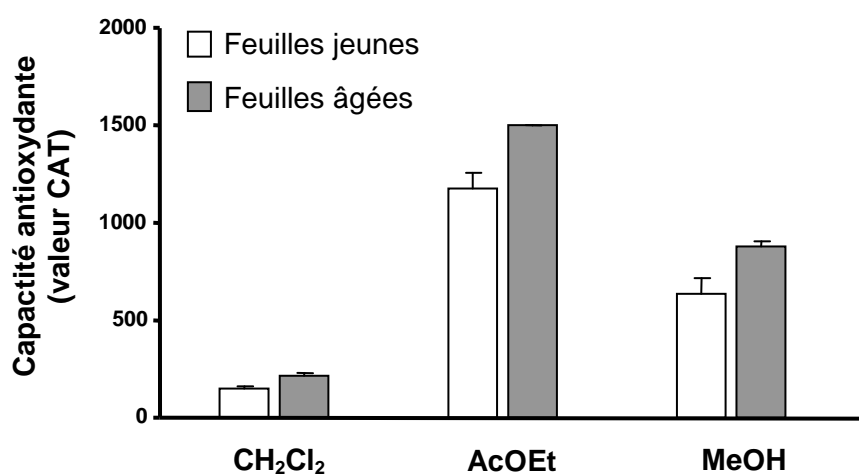


Fig. 71. Valeurs CAT (exprimées en μmol de Trolox/g d'extrait sec) de trois extraits différents (CH₂Cl₂, dichlorométhane ; AcOEt, acétate d'éthyle ; MeOH, méthanol) de feuilles jeunes et âgées.

L'évaluation de la capacité antioxydante par la méthode CAT a montré que, quel que soit le solvant d'extraction employé, les extraits de feuilles âgées exercent des activités antioxydantes supérieures aux extraits de jeunes feuilles. Ainsi, pour les extraits au dichlorométhane, les valeurs CAT des feuilles jeunes sont de 146 ± 18 μmol d'équivalent Trolox (ET)/g d'extrait, tandis que celles correspondant aux feuilles âgées sont de 211 ± 19 μmol ET/g d'extrait. De manière analogue, pour les extraits à l'acétate d'éthyle et au méthanol de feuilles jeunes, les valeurs CAT sont respectivement de 1178 ± 81 et 633 ± 83 μmol ET/g d'extrait, tandis que celles pour les feuilles âgées sont de 1494 ± 6 et 873 ± 35 μmol ET/g d'extrait. Ces différences peuvent en partie être expliquées par les bioconversions postulées précédemment. En effet, le verbascoside possède 2 structures catéchols, tandis que l'oleuropéine n'en contient qu'une et le ligstroside aucune. Or, comme nous l'avons déjà mentionné, une structure de type catéchol confère une meilleure stabilité au radical dérivé de l'antioxydant. Ainsi, lors de la rupture homolytique de la liaison O-H, une liaison hydrogène peut s'établir entre l'atome portant l'électron non apparié et le groupement hydroxyle adjacent. L'établissement de cette liaison permettrait ainsi d'augmenter la stabilité du radical et, par conséquent, d'abaisser l'énergie de dissociation homolytique (BDE) des groupements hydroxyles correspondants (Santos et Simoes, 1998 ; Wright *et al.*, 2001). Ainsi, la bioconversion d'un composé exempt de structure catéchol (ligstroside) ou comportant seulement un motif catéchol (oleuropéine) en un composé à structure bi-catécholique (verbascoside), pourrait expliquer la meilleure activité globale des feuilles âgées. Partant de ce principe, la formation potentielle d'oleuroside (un catéchol) à partir de ligstroside (zéro catéchol) suppose une amélioration de l'activité antioxydante. En contrepartie, si l'oleuroside dérive du métabolisme de l'oleuropéine, aucune amélioration significative de l'activité antioxydante n'est attendue, puisque les deux molécules contiennent le même motif catéchol.

Concernant les flavonoïdes, la bioconversion des isomères de diosmétine (zéro catechol) (**Fig. 64**) en glucosides de lutéoline (un catechol) pourrait également expliquer la meilleure activité antioxydante des extraits de feuilles âgées. Toutefois, il est plus délicat d'interpréter l'influence de la bioconversion potentielle de l'aglycone de quercétine en glucoside(s) de lutéoline sur la capacité antioxydante. En effet, bien que la lutéoline n'ait pas été testée au moyen de la méthode CAT, nous avons préalablement montré que la présence d'une double liaison C₂-C₃ sur l'hétérocycle C associée à la présence d'un groupement hydroxyle en position 3 permettait d'accroître la capacité d'un flavonoïde à piéger un radical libre, ce

résultat ayant par la suite été confirmé au moyen des méthodes DPPH et ORAC_{FL} (section 3.2.). Ainsi, le motif quercétine semble exercer une activité antioxydante supérieure à celle du motif lutéoline pour lequel l'hydroxyle en position 3 de l'hétérocycle C fait défaut. Par conséquent, la bioconversion de la quercétine en lutéoline, même sous sa forme glucosylée, suppose une moindre capacité antioxydante pour les extraits correspondants. Finalement, considérant le nombre de structures catéchols comme un indice de l'activité antioxydante, nous pouvons avancer l'hypothèse que durant le vieillissement des feuilles d'olivier, (i) certaines bioconversions (oleuropéine/ligstroside → verbascoside ; aglycone de diosmétine → glucosides de lutéoline) induisent un effet positif sur l'activité antioxydante, (ii) d'autres bioconversions (quercétine → glucosides de lutéoline) un effet négatif, tandis que (iii) d'autres encore n'exercent pas d'effet significatif (oleuropéine → oleuroside). Globalement, le cumul de tous les effets ponctuels (positifs ou négatifs) conduit à une amélioration globale (25 %) de la capacité antioxydante des extraits obtenus à partir des feuilles âgées comparée aux jeunes feuilles d'olivier. À long terme, de plus amples expérimentations impliquant notamment la mesure par la méthode CAT de composés purs comme la lutéoline-7-O-glucoside seront nécessaires pour élucider l'impact de ces évolutions chimiques sur la capacité antioxydante.

3.4. CONCLUSION

En conclusion, la composition phénolique des feuilles d'olivier varie dans le temps, probablement selon deux bioconversions principales : celle des aglycones de flavonoïdes en glucosides de lutéoline, et celle des glucosides d'hydroxytyrosol (oleuropéine, oleuroside et ligstroside) en verbascoside. Il ressort de cette étude que ces variations du profil phénolique ont exercé un effet significatif sur la capacité antioxydante des extraits, comme cela a pu être mesuré en employant la méthodologie CAT. Parmi tous les extraits testés, l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles âgées a exercé la plus forte capacité antioxydante en milieu émulsifié. Ce résultat pourrait être utilement employé au développement de produits cosmétiques ou d'additifs alimentaires. Il démontre clairement, par ailleurs, que la méthode CAT est adaptée à l'étude d'extraits végétaux.

4. Étude de la capacité antioxydante sur cultures cellulaires

4. ÉTUDE DE LA CAPACITÉ ANTIOXYDANTE SUR CULTURES CELLULAIRES

Le stress oxydant, résultant d'un déséquilibre entre les systèmes antioxydants et la production d'oxydants comme les espèces réactives de l'oxygène (ERO), semble être lié à de nombreuses maladies plurifactorielles au premier rang desquelles figurent les cancers (Kawanishi *et al.*, 2002), les maladies cardio-vasculaires (Sachidanandame *et al.*, 2005) et l'inflammation (Bodamyali *et al.*, 2000). Les mécanismes par lesquels ces pathologies se développent impliquent généralement l'altération oxydative de molécules d'importance physiologique comme les protéines, les lipides et les acides nucléiques, ainsi que la modulation de l'expression des gènes et de la réponse inflammatoire. Au cours de l'évolution, les organismes aérobies dont l'Homme, se sont adaptés pour contrer les effets délétères du stress oxydant, notamment par la mise en place de systèmes de défense. Parmi eux, les systèmes enzymatiques, notamment les superoxyde dismutases, les catalases, les glutathion peroxydases ainsi que les systèmes thiorédoxines, sont reconnus comme étant les plus performants dans la détoxification des EROs. Les principaux systèmes antioxydants non enzymatiques présents dans l'organisme humain regroupent, quant à eux, le glutathion, la bilirubine, les hormones sexuelles œstrogéniques, l'acide urique, les formes ubiquinol/ubiquinone, et l'acide dihydrolipoïque. En outre, nombre d'études s'accordent aujourd'hui sur l'importance de la contribution des antioxydants exogènes, apportés notamment par l'alimentation, dans la lutte contre le stress oxydant. Ces antioxydants, essentiellement d'origine végétale, sont apportés sous la forme de composés phénoliques, de tocophérols, de tocotriénols, d'acide ascorbique et de caroténoïdes. Se pose alors la question de leur efficacité réelle et des outils nécessaires à leur évaluation.

De nombreuses études ont porté sur la modulation du stress oxydant cellulaire par les composés phénoliques, *via* leur action antioxydante en particulier. Les modèles d'études employés vont des cellules en culture *in vitro*, à l'essai clinique chez l'Homme, en passant par les modèles animaux. Les cultures cellulaires présentent l'intérêt d'être plus représentatives des processus oxydatifs à l'œuvre en biologie, que les systèmes chimiques de type CAT ou ORAC, mettant simplement en jeu un substrat oxydable, un milieu, un oxydant et un antioxydant. De plus, ces cultures cellulaires constituent une approche plus simple à mettre en œuvre que les modèles animaux ou humains.

Généralement, l'étude du stress oxydant dans des systèmes cellulaires implique l'utilisation d'inducteurs exogènes des phénomènes d'oxydation comme l'antimycine A (inhibition du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale), les LDLs oxydés, les métaux de

transition, les initiateurs azo ou les hydroperoxydes. Cependant, il est souvent difficile de distinguer les effets propres de l'antioxydant, de ceux, plus complexes, provenant de l'interaction de ces derniers avec les inducteurs d'oxydation utilisés. L'emploi de métaux de transition peut ainsi interférer fortement dans l'évaluation de la capacité antioxydante. Il a ainsi été montré que l'ordre d'efficacité antioxydante d'anthocyanines vis-à-vis de LDLs était totalement différent selon la concentration de cuivre employée (Satué-Gracia *et al.*, 1997). Frankel et Meyer (2000) ont attribué cette influence au fait que les anthocyanines agissaient par l'intermédiaire de différents mécanismes d'action incluant notamment la réduction d'espèces oxydantes et la chélation du cuivre. De surcroît, l'utilisation de métaux de transition peut faire basculer le comportement d'un composé comme l'acide ascorbique d'antioxydant à pro-oxydant. En effet, l'acide ascorbique peut réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} , ce dernier pouvant catalyser par la réaction de Fenton, la réduction du peroxyde d'hydrogène en radicaux hydroxyles (Niki et Noguchi, 2000). En marge des métaux de transition, l'emploi des initiateurs azo comme le 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochlorhydrique (AAPH) peut également être sujet à critique. Leur mode d'action, et notamment la possibilité que les peroxyradicaux générés dans le milieu extracellulaire puissent traverser la membrane cytoplasmique, est mal connu. Takahashi *et al.* (2001) ont ainsi observé que l'incubation de lignées cellulaires de type monoblaste avec l'AAPH induisait seulement une oxydation membranaire et non cytosolique, venant probablement de l'extérieur de la cellule. Dans ce cas de figure, un antioxydant efficacement internalisé par la cellule pourrait s'avérer être un mauvais piègeur de radicaux libres. Un tel biais pourrait ainsi fausser les interprétations dans l'estimation du potentiel antioxydant d'une molécule donnée. D'autre part, comme le reporte Tsuchiya *et al.* (2001), l'utilisation d'initiateur combiné aux molécules antioxydantes peut s'accompagner d'une augmentation de la turbidité dans la cellule, ce qui rend impossible le suivi de l'oxydation en utilisant des sondes fluorogéniques ou fluorescentes. Finalement, quel que soit l'initiateur choisi, il apparaît que l'étude des propriétés antioxydantes d'une molécule donnée peut souffrir de biais expérimentaux non négligeables, dus à l'impossibilité d'isoler l'effet propre de l'antioxydant.

Pour contourner en partie cette difficulté, l'équipe du Dr G. Cabello a récemment développé par transgénèse une nouvelle lignée de fibroblastes humains caractérisée par une production endogène importante d'espèces oxydantes d'origine mitochondriale. Cette particularité rend possible l'évaluation de la capacité antioxydante de diverses molécules sans avoir recours aux inducteurs exogènes classiques d'oxydation, pour une durée d'analyse généralement

équivalente à celle utilisée dans ces conditions. Avec cette lignée, la durée d'analyse est uniquement déterminée par le temps d'incubation des substances antioxydantes nécessaire à l'observation d'effets significatifs.

Outre les conditions d'oxydation, la seconde problématique concerne l'évaluation, au sein des cellules en culture, de la capacité antioxydante des substances testées. Comme nous l'avons préalablement abordé, cette mesure nécessite d'estimer les phénomènes oxydatifs. Deux stratégies sont généralement utilisées : la mesure de la disparition d'un substrat oxydable, ou la mesure de l'apparition de produits d'oxydation. Or, dans un système complexe, il semble délicat de discerner du « bruit de fond » cellulaire ambiant, le signal d'un *quelconque* substrat ou produit d'oxydation endogène. Cette limitation a conduit à l'emploi de sondes exogènes, artificielles pour la plupart, de nature parfaitement définie et manifestant des propriétés spectrales spécifiques. Il est généralement admis que le suivi de leur dégradation oxydative au sein de la cellule constitue un indicateur du niveau des espèces oxydantes présentes.

Nous avons précédemment cité des exemples de sondes fluorescentes comme l'acide *cis*-parinarique, les fluorescéines lipophilisées et les sondes BODIPY dont l'oxydation induit une chute de fluorescence. À l'inverse, une sonde fluorogénique constitue la forme réduite (ou dihydro-) non fluorescente d'un fluorophore. L'oxydation de la molécule fluorogénique (2',7'-dihydrodichlorofluorescéine, dihydrorhodamine 123, dihydrofluorescéine, dihydroéthidium, etc.) restaure le système conjugué du fluorophore dont elle dérive et induit par conséquent l'apparition de la fluorescence. Les propriétés physico-chimiques (lipophilie, hydrophilie, biomiméticité, biodistribution, diffusivité post-oxydative, ...) et spectrales (sensibilité aux interférences spectrales, déplacement de Stokes, compatibilité des longueurs d'onde d'excitation et d'émission avec l'appareillage optique disponible, rendement quantique, susceptibilité à la photoxydation, ...) sont des critères qui orientent bien évidemment le choix d'une sonde. Parmi ces critères, la présence ou l'absence de spécificité pour une espèce oxydante particulière ainsi que la localisation de la sonde dans l'environnement pluricompartimenté cellulaire sont primordiales. Il est ainsi possible de distinguer les espèces oxydantes mitochondriales et cytosoliques (Diaz *et al.*, 2003). En outre, une sonde exogène simple à mettre en œuvre et présentant des propriétés spectrales compatibles avec tous types d'appareillage (système optique à filtre ou à monochromateur) semble avantageuse.

Dans ce contexte, nous avons choisi de mettre à profit le potentiel prometteur des cellules à forte production endogène d'espèces oxydantes, pour évaluer la capacité antioxydante de

molécules modèles. Dans ce chapitre, nous décrivons la mise au point expérimentale et l'application de cette nouvelle méthode aux composés phénoliques.

4.1. CHOIX DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Le type cellulaire adopté, le choix et l'optimisation des conditions opératoires dans ce type d'approche vont essentiellement concerner la nature de la sonde exogène, la densité cellulaire à mettre en œuvre, ainsi que le temps d'incubation et le mode d'incorporation des substances antioxydantes.

Dans cette étude, les sondes exogènes présentant un faible déplacement de Stokes, comme les sondes BODIPY, n'ont pas été retenues. En effet, la proximité de leurs spectres d'excitation et d'émission nécessite une correction de l'intensité d'émission par le spectre d'excitation. Par ailleurs, l'utilisation de certaines sondes exogènes est sujette aux interférences provenant de la formation de lipofuscines (~ 430-490 nm), comme c'est le cas de l'acide *cis*-parinarique ou de ses dérivés phospholipidiques qui présentent une émission maximale vers 413 nm (Sklar *et al.*, 1975 ; Kuypers *et al.*, 1987). En parallèle, Hempel *et al.* (1999) ont rapporté l'absence de spécificité des sondes fluorogéniques envers une espèce oxydante particulière. Par conséquent, ces sondes fournissent seulement une information générale relative aux réactions d'oxydation ayant lieu au cours d'un stress oxydatif cellulaire. À ce titre, elles possèdent l'avantage de pouvoir être utilisées afin d'étudier le potentiel antioxydant global de diverses molécules ce qui constituait l'un de nos objectifs. Parmi elles, nous avons sélectionné la 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine, très largement utilisée dans la littérature. L'étude de son comportement dans l'environnement cellulaire est donc bien documentée, notamment au niveau des possibles artefacts, ce qui présente un avantage certain quant à l'interprétation des résultats. En outre, son absence de spécificité pour une espèce oxydante particulière et sa localisation cytosolique (Nègre-Salvayre *et al.*, 2002) semblent adaptés à l'évaluation en première approche du potentiel antioxydant de diverses molécules en utilisant le modèle des fibroblastes à forte production d'espèces oxydantes. Si une information plus spécifique s'avérait nécessaire, concernant notamment la localisation cellulaire de l'antioxydant, des sondes plus spécifiques, comme la dihydrofluorescéine à localisation mitochondriale (Diaz *et al.*, 2003), pourraient être employées.

Enfin, selon Nègre-Salvayre *et al.* (2002), l'utilisation d'esters de sondes fluorogéniques permet une meilleure internalisation cellulaire par rapport à la sonde non estérifiée. À l'intérieur de la cellule, la fonction ester est hydrolysée par des estérases intracellulaires pour

générer la 2',7'-dihydrodichlorofluorescéine, qui forme un composé fluorescent, la 2',7'-dichlorofluorescéine (**Fig. 72**) après oxydation par les espèces oxydantes intracellulaires.

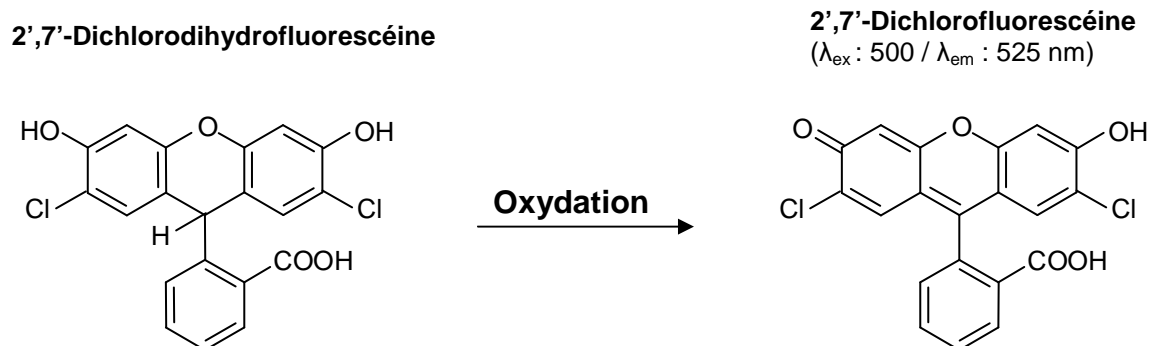


Fig. 72. Oxydation de la 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine en 2',7'-dichlorofluorescéine.

Généralement, la fluorescence résultante peut être observée par microscopie à fluorescence, ou mesurée par spectrofluorimétrie ou cytométrie de flux. Le choix de la technique de détection utilisée dépend notamment du type cellulaire. En effet, la cytométrie de flux est largement employée pour les cellules cultivées en suspension¹⁸ (lymphocytes, cellules HeLa) ; la microscopie ou la spectrofluorimétrie étant plus indiquées pour les cellules adhérentes telles que les fibroblastes. Ce constat nous a conduits à utiliser l'estimation par spectrofluorimétrie de la fluorescence associée à l'oxydation de la sonde. En outre, pour satisfaire l'objectif de haut débit, une optimisation des principaux paramètres opératoires a été réalisée sur microplaques de 96 puits.

Ce test est donc basé sur la modification de l'intensité de la fluorescence des esters acétiques de 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine (DCHF-H₂) induite par différentes concentrations d'antioxydants.

Le second paramètre à optimiser concerne la densité cellulaire à mettre en œuvre. Lors de la phase de prolifération, les cellules croissent après ensemencement jusqu'à former un tapis cellulaire homogène sur toute la surface du fond d'un puits de microplaque. Après la formation de ce tapis, connue sous le nom de confluence, débute la phase de différenciation cellulaire au cours de laquelle le phénotype des cellules susceptibles de subir un processus de différenciation change. Pour étudier les cellules en phase de prolifération tout en évitant les effets complexes de la différenciation, une densité cellulaire de 10000 cellules/puits s'est

¹⁸ Notons que la cytométrie de flux peut néanmoins être employée sur des cellules adhérentes après trypsinisation.

révélée adaptée. Cette densité cellulaire est d'ailleurs couramment utilisée pour ce type de test réalisé en microplaque 96 puits (diamètre : 6 mm), sur fibroblastes de derme humain (Hidalgo *et al.*, 1998) ou sur lignée cellulaire d'hépatomes humains (Alia *et al.*, 2006).

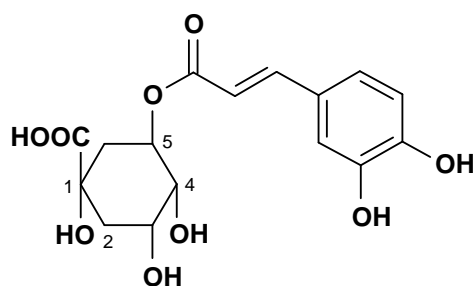
Outre la densité cellulaire, le mode d'incorporation des substances à tester est un paramètre crucial. Or, le caractère lipophile d'un grand nombre d'entre elles n'est pas compatible avec la préparation d'une solution mère aqueuse dans des milieux de type Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). Généralement, les composés hydrophobes (mais également les composés hydrophiles) sont incorporés au milieu de culture sous la forme de solutions organiques, en utilisant, par exemple, l'éthanol ou le diméthylsulfoxyde comme solvant. Ce mode d'incorporation permet ainsi d'étudier une large gamme de molécules. D'autre part, les substances antioxydantes et plus particulièrement les composés phénoliques sont plus stables en solution organique qu'en milieu aqueux. À cet égard, Zhu *et al.* (2000) ont montré que la myricétine (flavonol) était complètement dégradée après quatre heures de stockage dans une solution aqueuse. Se pose alors la question de la nature du solvant ainsi que de la quantité qui va être incorporée au milieu de culture final pour obtenir des conditions de culture optimales. Les solvants cytotoxiques (à faible dose) comme le méthanol, l'acétone ou l'acétonitrile sont bien évidemment à proscrire. Dans cette étude, nous avons solubilisé les composés phénoliques dans l'éthanol. Par la suite, 2 μ L de cette solution ont été additionnés à 2 mL de milieu de culture, l'éthanol y étant concentré à 0,1 % (vol), ce qui représente des concentrations couramment rencontrées dans ce type de test (Lotito et Frei, 2006). La possibilité que l'éthanol induise un effet antioxydant en lui même sera par la suite évaluée. Enfin, concernant la durée d'exposition, l'étude s'est plus particulièrement focalisée sur l'exposition chronique des cellules à différentes concentrations de ces composés (24, 48 et 72 h) puisque des effets significatifs ont pu être observés en moins de 72 h.

4.2. ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS ANTIOXYDANTES DE COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

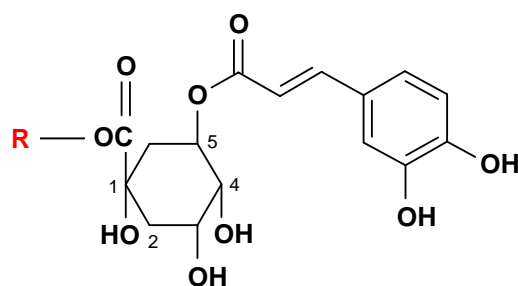
Les cultures cellulaires constituent des systèmes hautement organisés et compartimentés, dans lesquels la modulation des fonctions cellulaires par des substances antioxydantes telles que les composés phénoliques est dépendante de leur mécanisme d'action, mais également de leur localisation. Le mécanisme d'action le plus direct impliquerait la diffusion à travers la membrane cytoplasmique du composé phénolique, celui-ci réduisant par la suite les espèces oxydantes par contact direct à l'intérieur de la cellule. Cependant, des mécanismes d'action indirects, plus complexes ne peuvent être écartés. Les composés phénoliques pourraient en

effet interagir au niveau des lipides ou des protéines membranaires, induisant une diminution de la quantité d'espèces oxydantes par l'intermédiaire de cascades réactionnelles. Or, la perméation à travers la membrane ou une éventuelle interaction au niveau membranaire est probablement dépendante de la structure de la molécule, en particulier de son caractère hydrophobe. Dans ce contexte, l'étude de l'influence de l'hydrophobie des composés phénoliques sur les phénomènes oxydatifs cellulaires semble particulièrement pertinente. Cependant, la majorité des études mettent en œuvre des composés phénoliques présentant des structures différentes. Ainsi, l'influence réelle de l'hydrophobie sur l'activité anti-oxydante peut être masquée par d'autres paramètres physico-chimiques des molécules testées. Dans le but de focaliser l'étude sur l'hydrophobie, nous avons choisi d'étudier l'activité antioxydante d'une série homologue d'esters d'acide 5-caféoylquinique, lesquels diffèrent seulement entre eux par la longueur de la chaîne alkyle (**Fig. 73**).

Acide 5-caféoylquinique



Esters d'acide 5-caféoylquinique



R : CH₃
 R : -(CH₂)₃-CH₃
 R : -(CH₂)₇-CH₃
 R : -(CH₂)₁₁-CH₃
 R : -(CH₂)₁₅-CH₃

5-caféoylquininate de méthyle
 5-Caféoylquininate de butyle
 5-caféoylquininate d'octyle
 5-caféoylquininate de dodécyle
 5-caféoylquininate d'hexadécyle

Fig. 73. Composés phénoliques modèles testés.

Ainsi, suivant les conditions opératoires préalablement choisies, la capacité antioxydante de différentes concentrations (0, 10, 25, 50 et 100 μ M) d'acide 5-caféoylquinique et de ses esters alkylés a été évaluée. L'étude s'est focalisée sur l'exposition chronique des cellules à différentes concentrations de ces composés (24, 48 et 72 h).

D'autre part, tenant compte du fait que ces composés phénoliques sont susceptibles d'influencer la croissance cellulaire, nous avons exprimé la fluorescence de la 2',7'-dichlorofluorescéine par rapport à la quantité d'ADN (exprimée en μ g d'ADN/puits). En outre, les composés phénoliques étant incorporés sous la forme de solution éthanolique, nous

avons évalué l'influence de la présence de 0,1 % d'éthanol sur la capacité antioxydante (**Fig. 74**). Or, aucun effet significatif n'a pu être observé. Néanmoins, par surcroît de précaution, les capacités antioxydantes observées ont été exprimées en pourcentage d'inhibition de l'apparition de 2',7'-dichlorofluorescéine en présence de la substance testée par rapport au contrôle sans antioxydant mais contenant le véhicule (éthanol) ; ces capacités antioxydantes étant rapportées à la quantité d'ADN en μg .

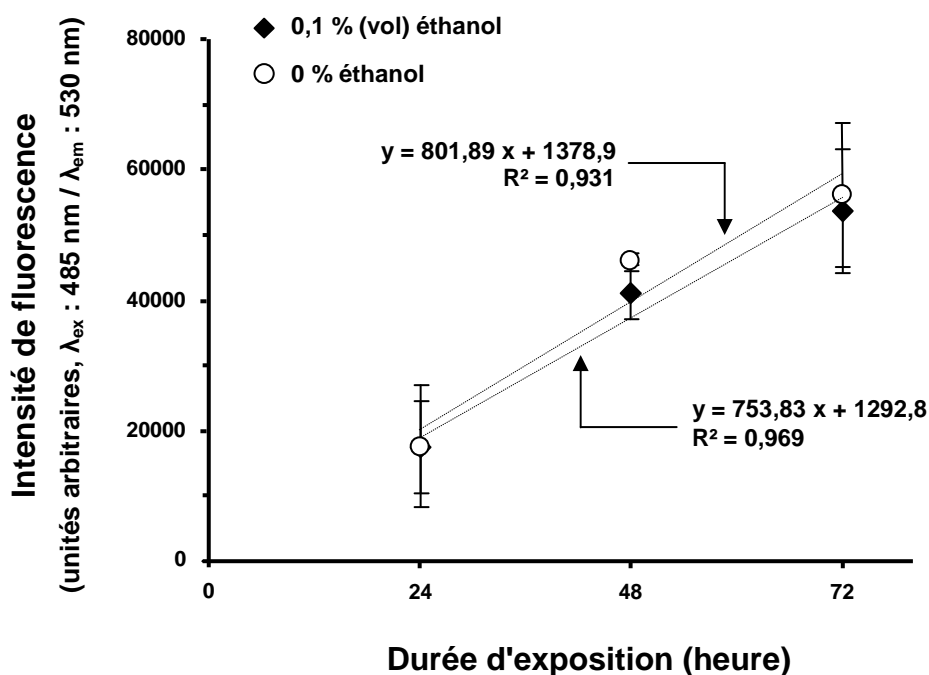


Fig. 74. Influence de l'éthanol sur la formation de 2',7'-dichlorofluorescéine (λ_{ex} : 485 nm/ λ_{em} : 530 nm). Le milieu de culture contient 100 μM de 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine-diacétate, 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal et 0,1 % (v/v) d'éthanol. Les résultats ont été exprimés comme la moyenne (\pm écart type) de 4 mesures indépendantes réalisées sur 4 microplaques différentesensemencées à partir de 4 suspensions cellulaires.

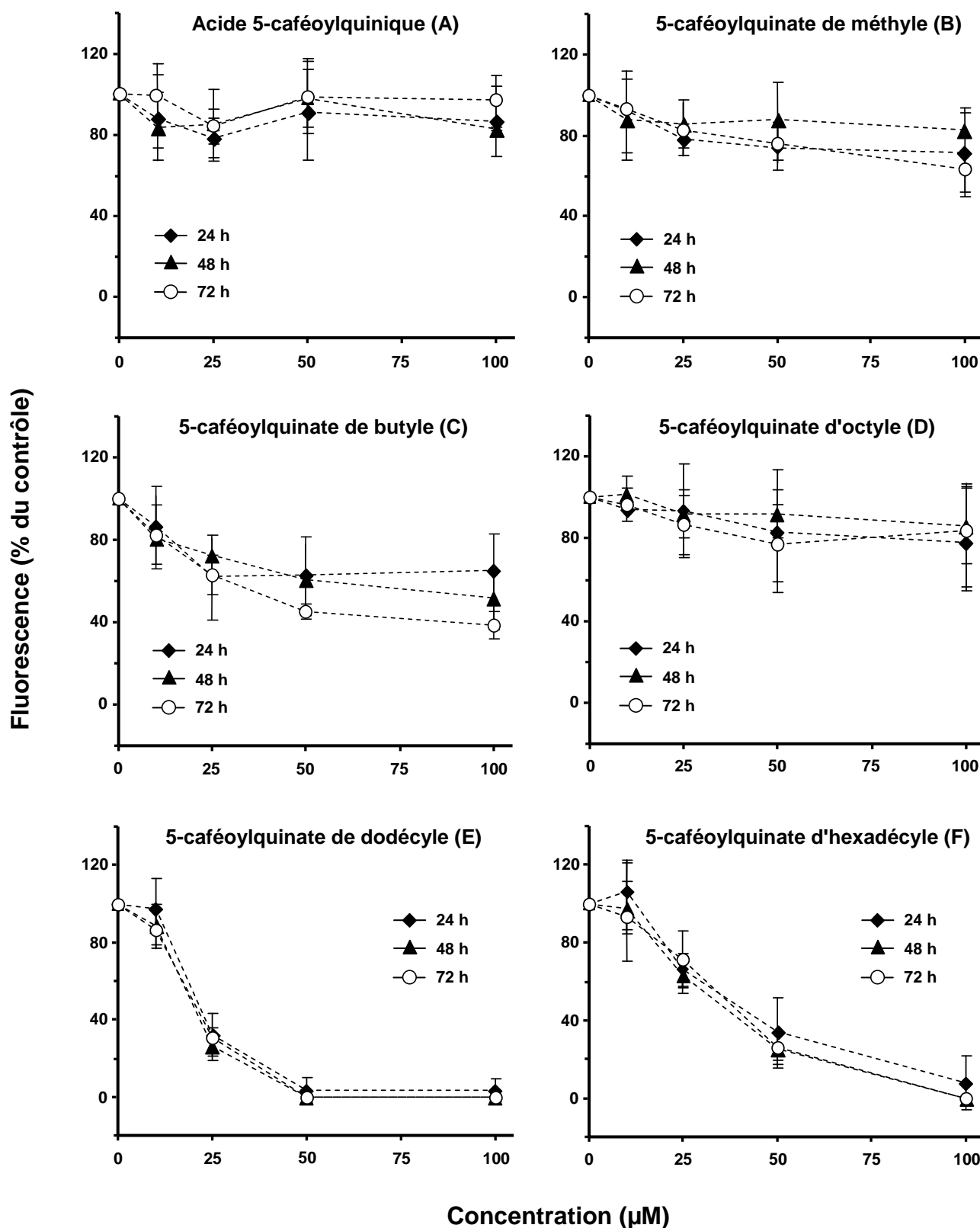


Fig. 75. Influence de l'acide 5-caféoylquinique et de ses esters alkyls sur la formation de 2',7'-dichlorofluorescéine (λ_{ex} : 485 nm/ λ_{em} : 530 nm). Le milieu de culture contient 100 µM de 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine-diacétate, 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal, 0, 10, 25, 50 et 100 µM de composés phénoliques et 0,1 % (v/v) d'éthanol. Les résultats ont été exprimés comme la moyenne (\pm écart type) de 4 mesures indépendantes réalisées sur 4 microplaques différentes ensemencées à partir de 4 suspensions cellulaires.

Il apparaît dans un premier temps que l'acide libre ainsi que les esters méthylque et octylique n'ont pas exercé d'inhibition notable de la fluorescence de la sonde durant les 72 h de traitement. En revanche une inhibition significative a été constatée pour les esters butylique, dodécylique et hexadécylique, ces deux derniers se caractérisant par la présence d'un effet dose-dépendant (**Figs. 75E et 75F**). Une longueur de chaîne de 12 atomes de carbone semble protéger de manière maximale la DCHF-H₂ de l'oxydation. Par contre, l'augmentation de la longueur de la chaîne de 12 à 16 atomes de carbone s'accompagne d'une diminution de cette capacité.

D'un point de vue quantitatif, la manière d'extraire une information pertinente à partir des données analytiques est cruciale. Généralement, la détermination de la concentration molaire nécessaire pour diminuer de 50 % le signal initial (EC₅₀) est utilisée, aussi l'avons-nous appliquée à l'acide 5-caféoylquinique et à ses esters alkylques (**Tableau 7**). Par souci de clarté, la capacité antioxydante a été exprimée en inverse d'EC₅₀ multiplié par 100 comme suit (**équation 21**):

$$\text{Capacité antioxydante} = 100 \times (1/\text{EC}_{50}) \quad (\text{Eq. 21})$$

| Composé | 100 x (1/EC ₅₀) ^a | | |
|------------------------------|--|------|------|
| | 24 h | 48 h | 72 h |
| Acide 5-caféoylquinique | nc ^b | nc | nc |
| 5-Caféoylquinat de méthyle | nc | nc | nc |
| 5-Caféoylquinat de butyle | nc | <1 | 2,3 |
| 5-Caféoylquinat d'octyle | nc | nc | nc |
| 5-Caféoylquinat de dodécyle | 4,8 | 5,3 | 5 |
| 5-Caféoylquinat d'hexadécyle | 2,6 | 2,9 | 2,7 |

^a Exprimée en μM⁻¹

^b Non calculable

Tableau 7. Valeurs de capacité antioxydante déterminées graphiquement à partir de l'EC₅₀ des courbes fournies sur la **Fig. 2**.

L'ester dodécylique présente ainsi une capacité antioxydante deux fois plus élevée que celle obtenue pour l'hexadécyle. Le cas de l'ester butylique est plus délicat à traiter puisque la durée de traitement semble influencer la capacité antioxydante, comme en témoignent les résultats obtenus avec la concentration de 100 μM sur la **Fig. 75C**. Après 24 h, aucune EC₅₀ n'a pu être déterminée dans la gamme des concentrations testées. En revanche, pour des

durées d'exposition de 48 et 72 h, les capacités antioxydantes ont été respectivement de ~ 1 et $2,3 \mu\text{M}^{-1}$. En outre, l' EC_{50} n'a pu être déterminée sur toutes les substances testées, comme en témoigne le cas de l'acide 5-caféoylquinique et de ses esters méthylique et octylique qui n'exercent pas d'inhibition notable. Ceci empêche d'étudier quantitativement l'influence de la longueur de la chaîne alkyle sur la capacité antioxydante de l'ensemble des molécules. D'autre part, il est à noter que, par définition, l'établissement de l' EC_{50} ne prend pas en compte les concentrations supérieures à cette valeur. Or, cela peut conduire à des estimations erronées, comme dans le cas des esters butylique et hexadécylique pour les traitements de 72 h. Ainsi, à cette durée d'exposition, la prise en compte de l' EC_{50} de ces deux composés laisserait supposer qu'ils exercent des capacités antioxydantes proches. Or, de toute évidence, l'ester hexadécylique exerce une activité antioxydante beaucoup plus marquée pour les concentrations les plus élevées.

Ce problème peut toutefois être contourné en considérant un indicateur bi-dimensionnel tel que l'intégration de la surface sous la courbe des concentrations : plus faible serait cette aire, plus forte serait la capacité antioxydante du composé considéré. Calculer ces aires supposent d'ajuster les points expérimentaux par un modèle mathématique. Pour cela, un modèle mathématique de type $y = a - [(a-d) * x^c] / (b^c + x^c)$ a été développé pour chaque courbe, les paramètres de ce modèle étant présentés dans le **Tableau 8**.

| Composé | Durée | Paramètres du modèle | | | | Erreur standard | R ² | Aire sous la courbe |
|---------------------------------|-------|----------------------|---------|-------|----------|-----------------|----------------|---------------------|
| | | a | b | c | d | | | |
| Acide 5-caféoylquinique | 24 h | 100,00 | 9,22 | 16,98 | 85,54 | 9,2989 | 0,80 | 8688 |
| | 48 h | 100,00 | 1,10 | 1,80 | 83,00 | - | - | 8380 |
| | 72 h | 99,82 | 5584,23 | 1,62 | -1885,68 | 0,0000 | 1,00 | 9872 |
| 5-Caféoylquininate de méthyle | 24 h | 100,02 | 14,78 | 2,37 | 71,79 | 0,5310 | 0,99 | 7726 |
| | 48 h | 100,00 | 4,87 | 0,46 | 78,75 | 0,0000 | 1,00 | 8487 |
| | 72 h | 100,14 | 156,94 | 0,84 | 10,09 | 2,1001 | 0,99 | 7699 |
| 5-Caféoylquininate de butyle | 24 h | 100,00 | 10,34 | 17,64 | 63,32 | 2,5413 | 0,99 | 6713 |
| | 48 h | 99,97 | 112,39 | 0,61 | -1,10 | 1,6104 | 0,99 | 6461 |
| | 72 h | 99,87 | 20,92 | 1,48 | 32,15 | 1,8874 | 0,99 | 5386 |
| 5-Caféoylquininate d'octyle | 24 h | 99,72 | 136,51 | 0,91 | 48,97 | 3,3394 | 0,98 | 8627 |
| | 48 h | 100,62 | 29,44 | 1,65 | 85,35 | 3,5741 | 0,95 | 9140 |
| | 72 h | 99,47 | 18,22 | 3,36 | 80,89 | 5,3178 | 0,96 | 8480 |
| 5-Caféoylquininate de dodécyle | 24 h | 99,71 | 21,35 | 5,35 | 3,05 | 1,0437 | 0,99 | 2492 |
| | 48 h | 99,72 | 18,72 | 3,40 | -1,73 | 2,3187 | 0,99 | 2048 |
| | 72 h | 99,46 | 19,43 | 3,05 | -2,71 | 3,6368 | 0,99 | 2130 |
| 5-Caféoylquininate d'hexadécyle | 24 h | 104,95 | 33,26 | 2,37 | 2,45 | 10,7598 | 0,99 | 4368 |
| | 48 h | 101,63 | 33,79 | 2,30 | -7,82 | 3,6603 | 0,99 | 3704 |
| | 72 h | 98,76 | 37,79 | 2,50 | -8,87 | 2,3097 | 0,99 | 3877 |

Tableau 8. Paramètres du modèle mathématique.

Le premier avantage de cette analyse est que l'effet de toute substance peut être quantifié. D'autre part, l'ensemble des concentrations utilisées est pris en compte avec le même poids, quelle que soit la cinétique enregistrée.

L'intégration de l'aire sous la courbe des concentrations a ainsi permis de classer (indépendamment de la durée d'exposition) l'efficacité antioxydante des composés phénoliques dans l'ordre suivant : 5-caféoylquininate de dodécyle > 5-caféoylquininate d'hexadécyle > 5-caféoylquininate de butyle > 5-caféoylquininate de méthyle ~ 5-caféoylquininate d'octyle ~ acide 5-caféoylquinique (**Fig. 76**).

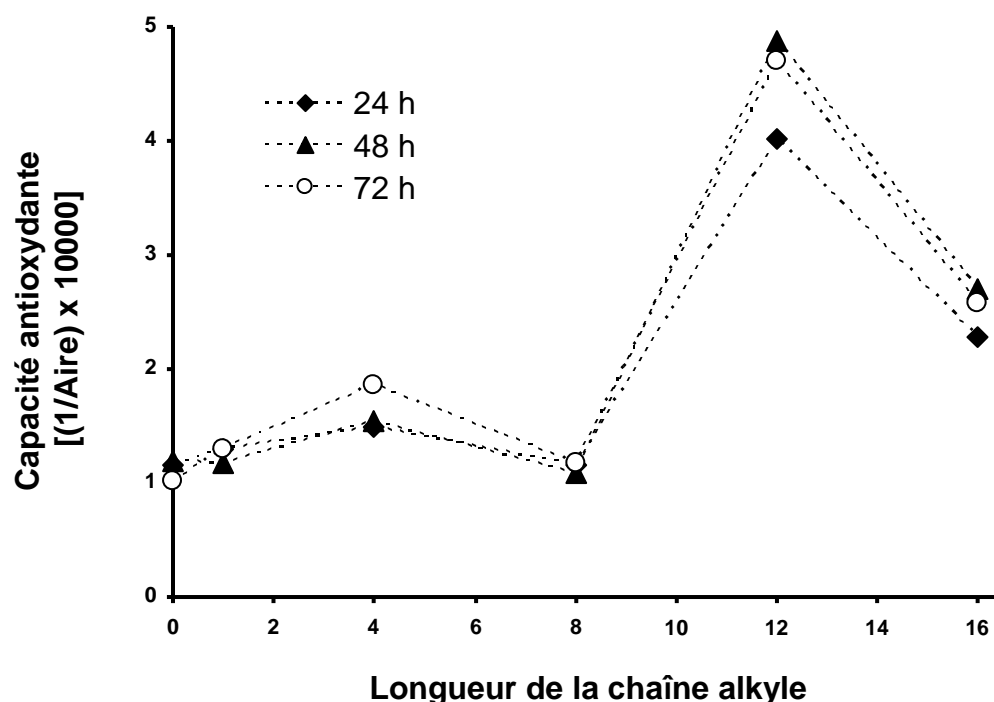


Fig. 76. Influence de la longueur de la chaîne alkyle sur la capacité antioxydante. La capacité antioxydante a été exprimée selon des unités arbitraires prenant en compte l'inverse de l'aire sous la courbe des concentrations présentées sur la **Fig. 75**.

Globalement, les composés phénoliques peuvent moduler le niveau des espèces oxydantes par une multitude de voies d'action. En essayant de classer ces effets, nous pouvons considérer deux grands types d'interaction selon qu'ils s'exercent en amont et/ou en aval de la génération des espèces oxydantes. L'interaction en amont concerne essentiellement une action des composés au niveau des complexes protéiques impliqués dans la production d'espèces oxydantes, mais peut également résulter d'une multitude de voies indirectes dont la modulation de l'expression des gènes. Une action en aval concerne en premier lieu une activité antiradicalaire par cession d'un atome hydrogène à un radical libre, mais peut également impliquer la modulation de l'expression des gènes pour la synthèse d'enzymes antioxydantes.

Comme nous l'avons préalablement abordé, la DCHF-H₂ semble être spécifiquement oxydée par les espèces oxydantes cytosoliques (Négre-Salvayre *et al.*, 2002). Or, le fait que la fluorescence de la DCHF-H₂ diminue en présence d'un antioxydant dans un type cellulaire donné, n'implique pas forcément que l'action antioxydante soit directement induite au niveau cytosolique. Ainsi, la possibilité d'une interaction en amont par inhibition de la production d'EROs mitochondriaux initiée au niveau membranaire ne peut être totalement écartée. En effet, la présence dans la membrane cytoplasmique de la NADPH oxydase, source

enzymatique d'EROs importante, pose avec acuité une telle question. L'inhibition de l'activité de cette enzyme par les substances testées au niveau de la membrane est en effet susceptible de diminuer la production d'EROs, et par voie de conséquence la fluorescence de la DCHF-H₂. Néanmoins, un tel mécanisme d'action semble peu probable avec le type cellulaire employé dans cette étude, puisque la production accrue d'espèces oxydantes est essentiellement d'origine mitochondriale. Dans ce contexte, une action inhibitrice sur la NADPH oxydase se traduirait vraisemblablement par un effet très modéré, ce qui n'est pas le cas de l'influence enregistrée pour les esters dodécylique (**Fig. 75E**) et hexadécylique (**Fig. 75F**) qui abrogent complètement le stress oxydant pour les concentrations les plus élevées. Au niveau mitochondrial, en revanche, une inhibition de la production d'EROs ou leur neutralisation au niveau cytosolique pourrait expliquer la forte décroissance du stress oxydant pour ces deux esters d'acide 5-caféoylquinique.

Concernant les interactions en aval, la neutralisation directe des espèces oxydantes cytosoliques par les substances utilisées constitue un mécanisme d'action probable. Dans ces deux cas, un transfert membranaire passif ou assisté assurant une localisation intracellulaire des antioxydants proches des sites de production de ces espèces oxydantes constituerait un atout déterminant pour piéger les espèces oxydantes. Dans ce cas de figure, nous pouvons avancer l'hypothèse selon laquelle la meilleure efficacité antioxydante des esters dodécylique et hexadécylique serait essentiellement attribuable à une meilleure internalisation au sein de la cellule. [Serrano et al. \(1998\)](#) ont à cet égard reporté que la fluorescence due à l'oxydation de la DCHF-H₂ était rapidement abaissée en présence d'ester dodécylique d'acide gallique, tandis que l'ester propylique nécessitait de plus longue période d'incubation. Ces résultats ont amené les auteurs à postuler que l'ester dodécylique présentait une meilleure perméabilité que son homologue.

En se focalisant sur les esters dodécylique et hexadécylique, la **Fig. 76** montre qu'un effet antioxydant maximum a été atteint pour une longueur de chaîne de 12 atomes de carbone, et qu'au-delà (16 atomes de carbone), une diminution de la capacité antioxydante est observée. D'après [Przestalski et al. \(2000\)](#), cette allure quasi-parabolique est connue en biologie sous le nom d'effet *cut-off* et a été communément observée dans l'étude de diverses activités biologiques ([Devinsky et al., 1990](#) ; [Locatelli et al., 2008](#) ; [Birnie et al., 2000](#)). Selon [Balgavy et Devinsky \(1996\)](#), l'effet *cut-off* rencontré en biologie a été observé pratiquement à chaque fois qu'une série homologue de molécules amphiphiles a été testée. Si le maximum d'activité pour la chaîne dodécylique peut vraisemblablement être attribué à une meilleure perméation des membranes biologiques, la diminution d'efficacité antioxydante observée suite à

l'élongation de la chaîne aliphatique est plus délicate à expliquer. De nombreuses théories ont été développées pour rationaliser ce phénomène, lesquelles sont principalement articulées autour de deux types d'interactions : les interactions avec les protéines membranaires et celles avec les lipides. Parmi différentes variantes concernant les interactions avec les protéines, [Richards *et al.* \(1978\)](#) ont proposé qu'une perturbation de la structure de protéines membranaires puisse être à l'origine de l'effet *cut-off*. A l'opposé, l'hypothèse selon laquelle la phase lipidique de la membrane serait le site d'action possible du phénomène de *cut-off* a été reportée et a donné lieu à de très nombreuses variantes.

Le grand nombre de théories tentant d'expliquer l'effet *cut-off*, vient probablement de la complexité des systèmes vivants étudiés et de la difficulté d'isoler un mécanisme particulier dans le « bruit de fond » cellulaire ambiant. Dans ce contexte, les tests *in vitro* acellulaires¹⁹ impliquant des systèmes plus simples sont fréquemment employés pour fournir des clés de compréhension (et non d'extrapolation) aux phénomènes cellulaires. Ainsi, dans l'optique d'approfondir l'étude du mode d'action antioxydant, nous avons soumis cette série homologue de composés phénoliques aux méthodologies CAT et DPPH.

4.3. ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS ANTIOXYDANTES EN SYSTEMES ACELLULAIRES

Pour cette étude en système *in vitro* acellulaire, les méthodes CAT et DPPH ont été choisies. L'acide 5-caféoylquinique et ses esters alkyliques ont été analysés selon les conditions décrites dans la section matériels et méthodes. Par ailleurs, notons que la méthode ORAC_{FL}, quant à elle, n'a pu être utilisée du fait de la nature amphiphile des composés testés.

Il apparaît sur la **Fig. 77**, que l'influence de la longueur de la chaîne alkyle sur la capacité antioxydante évaluée par la méthode CAT est similaire à celle observée sur les cultures cellulaires, avec un maximum d'activité pour l'ester dodécylique et une diminution de l'effet antioxydant pour l'ester hexadécylique. En revanche, pour la méthode DPPH, la tendance est différente de celle observée en milieu cellulaire avec un maximum d'activité pour les esters butylique et octylique. À ce propos, la méthode DPPH ne rend pas compte de la localisation de l'antioxydant vis-à-vis du substrat oxydable. En effet, la procédure DPPH n'implique ni substrat oxydable, ni système compartimenté, mais seulement un milieu homogène contenant les substances antioxydantes et le radical DPPH. Dans ce contexte, les résultats obtenus avec cette méthodologie semblent ne pas pouvoir fournir des clés d'interprétation pour expliquer le mécanisme d'action à l'origine de l'effet *cut-off* observé sur culture cellulaire.

¹⁹ Le terme acellulaire signifie que les expérimentations ont été réalisées en absence de cellule.

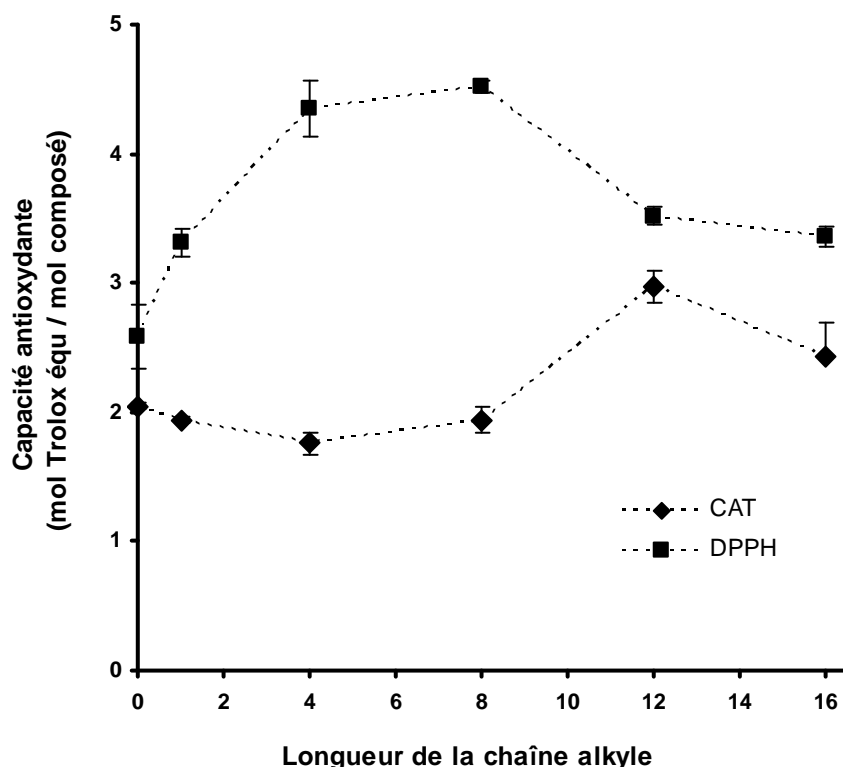


Fig. 77. Influence de la longueur de la chaîne alkyle sur la capacité antioxydante mesurée par les méthodes CAT et DPPH.

Concernant les résultats obtenus avec la méthodologie CAT, nous pouvons avancer l'hypothèse que jusqu'à huit atomes de carbone, la molécule correspondante reste majoritairement localisée dans la phase aqueuse, tandis que l'oxydation est initiée par les peroxyradicaux à l'interface huile-eau (**Fig. 78**). En d'autres termes, l'effet antioxydant de l'acide 5-caféoylquinique et de ses esters méthylique, butylique et octylique n'est pas optimal en raison d'un éloignement du substrat oxydable. En revanche, une capacité antioxydante maximale est atteinte pour une chaîne aliphatique comportant douze atomes de carbone, ce qui est probablement dû à un rapprochement, voire un ancrage de l'antioxydant vis-à-vis de la gouttelette d'huile de tung. Enfin, concernant la diminution d'activité pour 16 atomes de carbone, nous postulons que l'ester correspondant est majoritairement présent sous la forme de micelles. En effet, il est généralement admis que la concentration micellaire critique d'un composé donné diminue lorsque la longueur de la chaîne augmente (toute chose étant égale par ailleurs) (Yuji *et al.*, 2007). Ainsi, lorsque la longueur de la chaîne alkyle passe de 12 à 16 atomes de carbone, l'ester correspondant pourrait s'accumuler dans la phase aqueuse *via* un processus de micellisation. Or, une telle conformation présente trois inconvénients majeurs en termes de capacité antioxydante. Le premier consiste en un éloignement probable de l'antioxydant vis-à-vis de l'interface huile-eau qui constitue le site d'initiation de la

peroxydation lipidique. En second lieu, l'organisation des antioxydants en système micellaire rend difficile le piégeage efficace des radicaux libres dont la dispersion dans la phase aqueuse est vraisemblablement homogène. Enfin le processus de micellisation diminue fortement la mobilité des esters hexadécyliques, ce qui est incompatible avec la manifestation d'un effet antioxydant optimal.

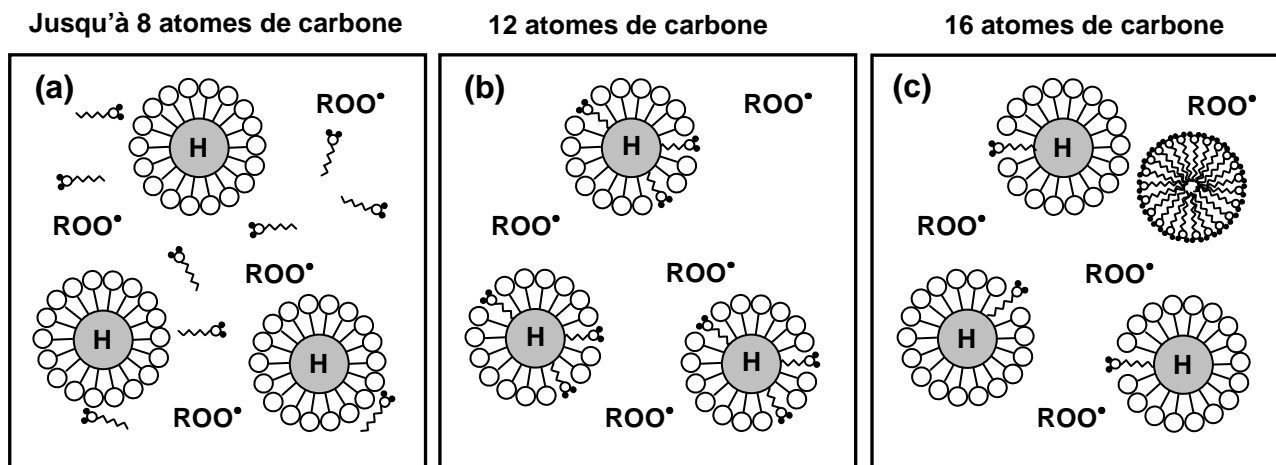


Fig. 78. Comportement potentiel de l'acide 5-caféoylquinique et de ses esters alkyls en émulsion de type huile dans eau.

Il ressort de cette analyse que le phénomène de *cut-off* observé en utilisant la méthodologie CAT s'explique par deux phénomènes. L'influence de l'augmentation de la longueur de la chaîne aliphatique (jusqu'à 8 atomes de carbone) sur l'activité antioxydante semble suivre la loi de Overton-Meyer ([Meyer, 1899](#) ; [Overton, 1901](#)). Cette loi énoncée il y a plus d'un siècle stipule que l'activité biologique (initialement l'activité anesthésiante) d'une substance donnée est corrélée à sa solubilité dans l'huile d'olive. Cependant, lorsque la chaîne aliphatique est allongée de 12 à 16 atomes de carbone, la loi de Overton-Meyer est incapable d'expliquer nos résultats, puisque la solubilité de chaînes hexadécyliques est similaire voire supérieure à celle de chaînes dodécyliques. Comme nous l'avons abordé, un phénomène de micellisation pourrait en revanche l'expliquer. En effet, la formation de micelles serait plus élevée dans le cas de l'ester hexadécylique que celui de l'ester dodécylique, puisque la CMC diminue par augmentation du caractère hydrophobe. D'autre part, le fait que la même tendance ait été observée pour la méthode CAT et les essais en culture cellulaire, suggère que le même mécanisme fondamental est à l'origine de l'effet *cut-off* enregistré dans les deux systèmes considérés.

Finalement, quel que soit le mécanisme mis en jeu, le test cellulaire utilisé pourrait permettre d'appréhender l'application potentielle de telles molécules au traitement du stress oxydant impliqué dans un grand nombre de pathologies incluant le diabète, les maladies cardiovasculaires (Sachidanandame *et al.*, 2005), les maladies neurodégénératives (Markesbery et Lovell, 1998 ; Yoritaka *et al.*, 1996) et les cancers (Kawanishi *et al.*, 2002). Cependant, l'application de ces molécules à des fins thérapeutiques suppose une absence de cytotoxicité dans la gamme des concentrations employées. Dans ce but, nous avons testé l'activité cytotoxique de l'acide 5-caféoylquinique et de ses esters alkyliques.

4.4. ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS CYTOTOXIQUES

La majorité des méthodes destinées à estimer la cytotoxicité est basée sur deux caractéristiques des cellules viables : l'activité métabolique et l'intégrité de leurs membranes. L'activité métabolique est bien souvent évaluée avec des sels de tétrazolium, lesquels sont clivés, dans les cellules métaboliquement actives, en un produit coloré, le formazan, détectable en fluorimétrie. Cependant, ces réactions dépendent directement de l'activité mitochondriale, modifiée dans les cellules utilisées. Elles ne constituent donc pas un test fiable de viabilité cellulaire dans notre modèle.

L'autre méthode couramment utilisée évalue indirectement l'intégrité des membranes cytoplasmiques par le niveau de lactate déshydrogénase (LDH) libérée dans le milieu extracellulaire. La lactate déshydrogénase est une enzyme cytosolique présente dans toutes les cellules de mammifères. En conditions physiologiques normales, la membrane cytoplasmique est imperméable à cette enzyme, mais les dommages membranaires qui précèdent la mortalité cellulaire induisent une fuite de la lactate déshydrogénase dans le milieu extracellulaire (Rae, 1977). La libération de cette enzyme fournit donc un indicateur de l'intégrité membranaire et indirectement de la cytotoxicité des substances testées.

Afin d'étudier l'effet cytotoxique des composés phénoliques sur les cellules à forte génération d'espèces oxydantes, ces dernières ont été exposées à cinq concentrations de composés phénoliques (0, 10, 20, 30 et 50 μM) durant 24, 48 et 72 h, selon les conditions précédemment décrites. Par ailleurs, comme ces composés sont également susceptibles d'influencer la croissance cellulaire et donc d'abaisser la quantité de LDH totale libérée par les cellules lésées, nous avons mesuré pour tous les échantillons, la quantité totale de lactate déshydrogénase présente dans les milieux extra- et intracellulaires. Pour cela, les puits dédiés à cette mesure (1 puits par échantillon) ont été exposés à une solution de lyse totale destinée à déstructurer les membranes de toutes les cellules et donc à libérer la totalité de la lactate

déshydrogénase. Le niveau de LDH libérée a par conséquent été exprimé en pourcentage de la quantité de LDH totale après lyse.

D'autre part, pour prendre en compte un éventuel effet de l'éthanol (qu'il s'agisse de cytotoxicité ou d'effet sur la prolifération), les valeurs de cytotoxicité obtenues pour les composés phénoliques ont été exprimées en pourcentage du contrôle (avec éthanol). Ainsi, en appliquant le mode de calcul présenté dans la section matériels et méthodes, la cytotoxicité obtenue pour les différentes concentrations et temps d'incubation des composés phénoliques testés a été reportée sur la **Fig. 79**.

La **Fig. 79** montre ainsi que la libération de la LDH dans le milieu extra-cellulaire fluctue grandement en fonction de la nature et des concentrations des composés phénoliques testés, ainsi que de leur temps d'incubation.

La nature chimique des composés influence fortement la cytotoxicité. En effet, seulement quatre d'entre eux (acide 5-caféoylquinique et ses esters méthylique, dodécylique et hexadécylique) semblent exercer un effet significatif sur la libération de la LDH, dans la gamme des concentrations testées. En effet, les esters butylique et octylique n'exercent aucun effet cytotoxique sur les cellules. Au niveau des concentrations, il est intéressant de noter que jusqu'à 25 μM , seul l'ester dodécylique semble exercer un effet potentiellement cytotoxique au troisième jour de traitement. Ainsi, la concentration d'ester dodécylique nécessaire pour induire une cytotoxicité est deux fois moins importante que celle observée pour l'ester hexadécylique. D'autre part, ces deux composés induisent une cytotoxicité dose-dépendante, tandis que la cytotoxicité de l'acide libre et son ester méthylique n'apparaît que pour la plus forte concentration (100 μM). Enfin, concernant l'influence du temps d'incubation, il est à noter que lorsqu'une forte activité cytotoxique est détectée (cas des concentrations les plus élevées), l'effet maximal est généralement atteint pour une durée d'exposition de 48 h, voire 72 h.

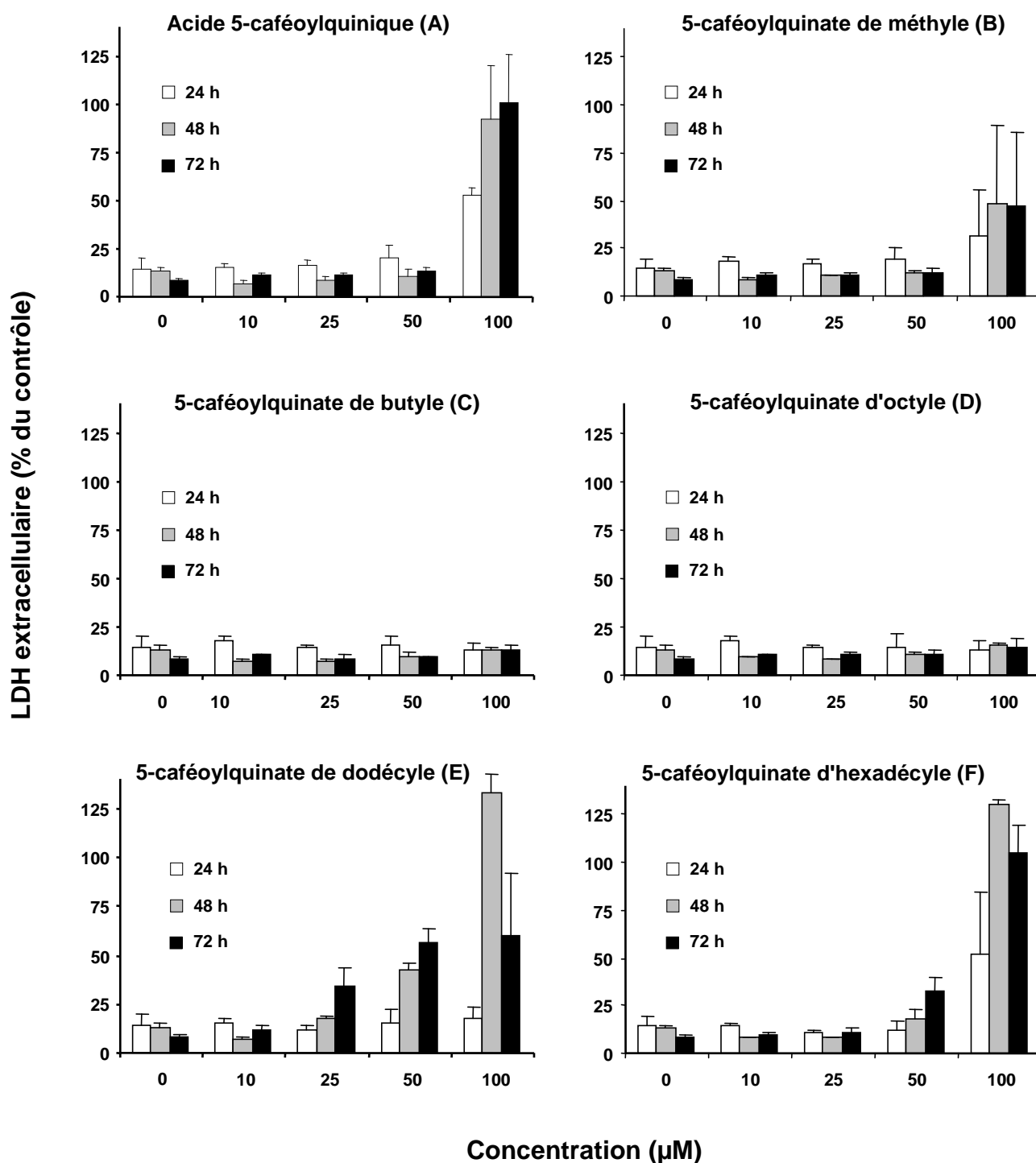


Fig. 79. Cytotoxicité de l'acide 5-caféoylquinique et de ses esters alkyls déterminée par la libération de lactate déshydrogénase (λ_{ex} : 560 nm/ λ_{em} : 590 nm). Le milieu de culture contient 0, 10, 25, 50 et 100 µM de composés phénoliques, 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal et 0,1 % (v/v) d'éthanol. Les résultats ont été exprimés comme la moyenne (\pm écart type) de 4 mesures indépendantes réalisées sur 4 microplaques différentesensemencées à partir de 4 suspensions cellulaires.

Par ailleurs, puisque la seule différence entre les composés phénoliques testés concerne la présence d'une fonction acide quinique libre ou d'une chaîne alkyle de longueur différente, la question se pose de savoir si l'effet cytotoxique peut être directement attribuable à la chaîne aliphatique (cas des esters) et/ou à la fonction acide du motif quinique (cas de l'acide 5-caféoylquinique). Plusieurs arguments expérimentaux reportés dans la littérature semblent infirmer ce cas de figure. Ainsi, [Leonardis et al. \(2008\)](#) ont récemment montré que l'incubation d'acide 5-caféoylquinique sur des cultures cellulaires de fibroblastes murins s'accompagnait d'un abaissement de la viabilité cellulaire, tandis qu'aucun effet n'était observé pour l'acide quinique seul. Pour un autre acide phénolique, l'acide gallique, qui induit une forte mortalité cellulaire sur des cellules leucémiques de type L1210, [Locatelli et al. \(2008\)](#) ont reporté que la méthylation des positions phénols (que ce soit sur l'acide libre ou son ester décylique) abrogeait l'induction de la mort cellulaire. De manière analogue, [Inoue et al. \(1995\)](#) ont montré que l'élimination des hydroxyles phénoliques de l'acide gallique s'accompagnait d'une disparition complète de leur cytotoxicité. Rapportées à notre cas, ces études suggèrent une médiation de l'activité cytotoxique par la fonction phénol et non par le groupement acide quinique qu'il soit libre ou estérifié.

En termes de mécanisme d'action, l'activité cytotoxique (notamment *via* l'induction d'un processus apoptotique) des composés phénoliques est souvent attribuée à une activité pro-oxydante. Ainsi, [Jiang et al. \(2000\)](#) ont suggéré que l'acide 5-caféoylquinique exerçait un effet cytotoxique sur des cellules tumorales humaines par formation d'espèces oxydantes, comme H_2O_2 . D'après leur étude, l'activité cytotoxique de l'acide 5-caféoylquinique sur des cellules squameuses de carcinome buccal humain et des tumeurs de glandes salivaires a été significativement abaissée en présence de catalase, qui permet de transformer H_2O_2 en H_2O et O_2 . En outre, ces auteurs ont montré au moyen de la résonance paramagnétique nucléaire que les plus fortes concentrations d'acide 5-caféoylquinique pouvaient conduire, en milieu acellulaire, à la formation de radicaux libres, tandis que, paradoxalement, les plus faibles concentrations exerçaient un effet antiradicalaire vis-à-vis de $O_2^{\cdot-}$ et HO^{\cdot} . [Qiu et al. \(2000\)](#) ont montré, pour leur part, que l'acide gallique induisait la mort cellulaire de cellules vasculaires de muscles lisses par l'intermédiaire de la production de HO^{\cdot} , tandis que [Sakaguchi et al. \(1998\)](#) ont suggéré que l'apoptose induite par l'acide gallique était médiée par H_2O_2 , bien que d'autres mécanismes d'action, comme l'élévation des concentrations intracellulaires de calcium, semblent également impliqués.

L'autre explication généralement formulée pour expliquer les effets cytotoxiques des composés phénoliques est la déplétion des défenses antioxydantes. Il est ainsi paradoxal de constater que l'addition de substances antioxydantes peut conduire, au final, à une déplétion d'antioxydants. Concernant l'acide 5-caféoylquinique, [Moridani et al. \(2001\)](#) ont suggéré que les acides

dihydroxycinnamiques tels que l'acide 5-caféoylquinique pouvaient être oxydés par voie enzymatique pour former des métabolites de nature quinonique, lesquels sont connus pour être cytotoxiques. Le mécanisme d'action impliquerait la forte réactivité des quinones vis-à-vis d'agents nucléophiles comme l'eau, les composés comportant un groupement thiol (glutathion, cystéine) ou amine libre. Ainsi, il peut être avancé que les formes quinoniques issues de l'oxydation bi-électronique de l'acide 5-caféoylquinique et de ses esters pourraient induire une déplétion en glutathion, cause plausible de cette activité cytotoxique. Or, en théorie, ce mécanisme d'action devrait provoquer une augmentation de l'oxydation de la 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine. Cependant, dans le cas des esters dodécylique et hexadécylique, le stress oxydant est complètement effondré (**Figs. 75E et F**) pour les concentrations exerçant un effet cytotoxique, ce qui semble infirmer un tel mécanisme d'action. En revanche, les quinones issues de l'action antioxydante des substances testées pourraient subir l'attaque d'autres nucléophiles importants pour l'homéostasie cellulaire mais qui ne sont pas impliqués dans la modulation des phénomènes oxydatifs. Par conséquent, leur déplétion n'abaisserait pas la fluorescence de la DCHF-H₂. D'autre part, nous avons préalablement observé que la manifestation d'une cytotoxicité significative nécessitait 48 h, tandis que l'activité antioxydante pouvait être détectée dès 24 h de traitement avec les substances testées. Cette observation suggère également que l'activité cytotoxique passe par la modulation de fonction(s) cellulaire(s) indépendante(s) du stress oxydant.

4.5. CONCLUSION

En conclusion, si les effets cytotoxique et antioxydant de l'acide 5-caféoylquinique et de ses esters procèdent de mécanismes d'action différents, il est néanmoins surprenant de constater que pour les deux activités, l'effet maximal ait été atteint pour une longueur de chaîne de douze atomes de carbone. De toute évidence, les activités cytotoxique et antioxydante sont directement induites par la fonction catéchol, mais cette action ne peut avoir lieu qu'une fois la molécule internalisée. C'est à ce dernier niveau qu'intervient vraisemblablement l'influence de la chaîne alkyle permettant pour les chaînes longues, et plus particulièrement la chaîne dodécylique, une perméation efficace au travers de la membrane. Il apparaît finalement que l'ester dodécylique de 5-caféoylquinique manifeste une puissante capacité antioxydante en milieu cellulaire, pour des concentrations et des durées d'exposition situées en dessous du seuil cytotoxicité. Dans ce contexte, et en parallèle d'études approfondies sur son mécanisme d'action, l'investigation de l'effet antioxydant de cette molécule sur modèle animal pourrait constituer à l'avenir une piste de recherche thérapeutique intéressante.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale et perspectives

Les propriétés antioxydantes des composés phénoliques constitutifs des végétaux suscitent depuis ces dernières décennies un grand intérêt dans le domaine de la nutrition et de la pharmacologie. Cet intérêt s'est accru à mesure que l'implication du stress oxydant dans les maladies plurifactorielles de type cancer ou inflammation a été démontrée. Ces maladies passent en effet par l'oxydation de cibles cellulaires d'importance biologique comme les lipides, les protéines, ou encore l'ADN. En marge des systèmes de défense ou de réparation endogènes que l'organisme a mis en place pour combattre le stress oxydant, un grand nombre d'études souligne aujourd'hui le rôle des composés phénoliques alimentaires dans la régulation de ces phénomènes oxydatifs. La question de leur réelle efficacité et des outils analytiques nécessaires à leur évaluation se pose alors avec acuité.

Le problème de la détermination de la capacité antioxydante a été présenté dans ce manuscrit, au regard du contexte et des mécanismes complexes d'oxydation et d'antioxydation. Nous avons vu que la complexité et la diversité des systèmes d'étude ont conduit au développement d'une multitude de tests, aucun d'entre eux ne présentant malheureusement le caractère universel espéré.

Dans ce contexte, l'un des objectifs de notre travail a été d'étudier les propriétés antioxydantes de composés phénoliques dans des systèmes variés impliquant notamment des milieux hétérogènes de type émulsion. Poursuivant cet objectif, la première étude a porté sur la conception, la mise au point expérimentale et l'application d'une nouvelle méthode de mesure de la capacité antioxydante appelée test des triènes conjugués autoxydables (*conjugated autoxidizable triene*, CAT). Cette méthode est fondée sur les propriétés spectrales des acides gras triénoïques conjugués constitutifs de l'huile de tung qui lui confèrent de fortes propriétés d'absorption dans le domaine ultraviolet à 273 nm. En émulsion, il s'est avéré que l'oxydation de l'huile de tung induite par un initiateur azo s'accompagnait d'une diminution drastique du signal ultraviolet. Ce comportement spectral a par conséquent été mis à profit pour suivre l'oxydation de l'huile de tung en absence ou en présence de différentes concentrations en composés phénoliques antioxydants.

L'étude des principaux paramètres opératoires nous a montré, dans un premier temps, que la quantité d'émulsifiant abaissait l'intensité du signal ultraviolet. Ce résultat nous a incités à utiliser la plus faible concentration d'émulsifiant testée, de manière à obtenir un signal spectral supérieur à une valeur d'absorbance de 0,7, valeur seuil en dessous de laquelle la

répétabilité des cinétiques d'oxydation diminue fortement. Par ailleurs, nous avons vérifié que les acides gras insaturés présents en faible proportion dans l'huile de tung n'induisaient pas d'absorbance dans la fenêtre spectrale des triènes conjugués. Enfin, un mode d'incorporation des substances antioxydantes sous forme de solution dans le méthanol a permis de tester des antioxydants de polarité différente, ce qui a augmenté la portée de la méthode.

Par la suite, lors de la mise en œuvre de substances antioxydantes, différents comportements cinétiques ont été observés. Ainsi, les β -tocophérols endogènes à l'huile de tung protègent cette dernière de l'oxydation en induisant une phase de latence hautement caractéristique des antioxydants briseurs de chaîne de peroxydation. Ce comportement suppose un rapprochement de l'antioxydant vis-à-vis des gouttelettes d'huile. L'autre type de cinétique enregistré semble caractéristique d'un comportement de type retardeur pour lequel l'antioxydant ne peut contrer la propagation radicalaire en chaîne, mais seulement son initiation. Ce comportement cinétique semble caractériser l'ensemble des acides phénoliques et des flavonoïdes testés. La présence ou l'absence de phase de latence a également souligné le problème du mode d'extraction de l'information. Dans ce contexte, le calcul de l'aire sous la courbe nous a semblé avantageux, puisqu'il permet de quantifier une capacité antioxydante indépendamment de la cinétique d'antioxydation.

À l'avenir, de nombreuses améliorations peuvent être envisagées aux premiers rangs desquelles nous pouvons citer l'oxydation naturelle et l'amélioration de la répétabilité qui passera par une meilleure maîtrise des conditions opératoires. Par ailleurs, l'étude de l'influence de la concentration de l'émulsifiant ainsi que de la longueur de sa chaîne hydrophobe sur le comportement antioxydatif permettrait de rationaliser la mesure de la capacité antioxydante en milieu émulsionné. En effet, de nos jours, peu d'études ont été consacrées à cette problématique, alors même que la majorité des travaux emploie des concentrations d'émulsifiants situées au dessus de leur concentration micellaire critique. Il est ainsi postulé que cet excès d'émulsifiant pourrait conduire à l'accumulation artificielle d'antioxydants lipophiles dans la phase aqueuse par un phénomène de transport micellaire, et par conséquent, biaiser les résultats de manière considérable. Dans ce contexte, la méthode CAT pourrait fournir un outil d'investigation innovant et pertinent puisqu'elle met en œuvre un substrat oxydable représentatif des substrats rencontrés au niveau alimentaire ou biologique.

La deuxième étude a consisté à caractériser les motifs structuraux impliqués dans le déterminisme de la capacité antioxydante de molécules phénoliques simples de type acides

phénoliques et flavonoïdes. Compte tenu de la pluralité des systèmes d'étude et des stratégies de mesure disponibles, nous avons choisi d'employer trois méthodologies *in vitro*: les tests 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL}) et CAT. Dans un premier temps, nous avons constaté que le nombre d'hydroxyles phénoliques pris indépendamment de leur position sur le noyau phénolique n'exerçait aucune influence significative sur la capacité antioxydante mesurée avec les trois méthodes. En revanche, il est apparu que la structure catéchol jouait un rôle majeur dans le déterminisme des valeurs ORAC_{FL} et CAT, mais semblait peu influente sur l'activité antiradicalaire telle que mesurée par la méthode DPPH. À cet égard, dans les trois méthodes, l'acide rosmarinique (deux structures catéchols) et la quercétine (une structure catéchol) ont exercé les capacités antioxydantes les plus élevées. Par ailleurs, il a clairement été établi dans les méthodes compétitives comme ORAC_{FL} et CAT que l'addition d'un hydroxyle phénolique en *ortho* de cette structure catéchol s'accompagnait d'une diminution drastique de la capacité antioxydante des molécules correspondantes. Ainsi, cet effet pourrait expliquer le fait que l'acide gallique qui comporte une structure pyrogallol exerce la plus faible capacité antioxydante dans ces deux tests. Pour les autres composés, il s'est avéré que l'ordre d'efficacité différait grandement d'un test à l'autre, ce qui incite à abandonner le terme antioxydant, tel que préconisé par [Mantle *et al.* \(1998\)](#), pour une désignation plus précise spécifiant, entre autre, la nature de l'espèce oxydante à réduire.

Les perspectives de ce travail sont multiples, mais concernent principalement l'augmentation du nombre de composés phénoliques analysés et de méthodes employées, ce qui permettrait à terme de faire émerger une vision plus globale. En outre, l'analyse de composés présentant des structures variées (plusieurs structures catéchols, présence de glycosylation(s), ...) permettrait d'améliorer la pertinence de l'analyse structure-activité. Ainsi, dans notre étude, la prise en compte d'un seul composé comportant deux structures catéchols, comme l'acide rosmarinique, a peut-être masqué la réelle influence de ce paramètre structural dans le déterminisme de la valeur DPPH.

D'autre part, compte tenu du fait que les composés phénoliques subissent de nombreuses modifications *in vivo* (méthylation, glucuronidation, ...) susceptibles de moduler leurs propriétés antioxydantes, il serait primordial à l'avenir de tester les métabolites de composés phénoliques. Cela permettrait d'augmenter considérablement la portée des études de type structure-activité qui sont malheureusement principalement axées sur les formes non circulantes. La mise sur le marché croissante de ce type de métabolites devrait conduire à une généralisation de leur étude. Enfin, le recours à des outils de modélisation moléculaire

pourrait permettre d'expliquer, en théorie, la chute de la capacité antioxydante lors du passage d'une structure catéchol à pyrogallol. La question est d'importance, notamment du fait que les composés renfermant une structure pyrogallol (acide gallique et ses esters, myricétine, épigallocatechine, gallocatechine, ...) sont largement présents dans notre alimentation.

La troisième étude a été consacrée à l'application de la méthodologie CAT à l'évaluation des propriétés antioxydantes de composés phénoliques en mélange au sein d'extraits végétaux. Parmi eux, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux extraits de feuilles d'olivier, qui renferment une gamme variée de composés de nature phénolique, allant des sécoiridoïdes aux glycosides de flavonoïdes. Pour cette étude, l'influence du degré de vieillissement des feuilles d'olivier a également été examinée et a montré que les feuilles âgées exerçaient des capacités antioxydantes significativement plus élevées que celles obtenues pour les feuilles jeunes. Cela a principalement été interprété au regard de deux mécanismes potentiels de bioconversion de composés phénoliques qui ont lieu durant le vieillissement des feuilles. Le premier concerne la transformation de l'oleuropéine, comportant une structure catéchol, en verbascoside qui est un antioxydant puissant renfermant deux structures catéchols. La deuxième voie de bioconversion postulée dans ce travail consiste en une glycosylation des flavonoïdes au cours du vieillissement, laquelle permettrait de stocker ces composés sous formes non toxiques pour le végétal. En outre, les différents résultats obtenus témoignent finalement de la faisabilité de la méthodologie CAT pour l'étude des propriétés antioxydantes d'extraits végétaux naturels.

À l'avenir, l'étude d'un grand nombre d'extraits végétaux permettrait de sélectionner les sources végétales aptes à être valorisées à des fins nutritionnelles, cosmétiques ou thérapeutiques. Cela participerait également à un effort de valorisation de la biomasse notamment celle issue des pays du Sud. D'autre part, la comparaison des propriétés de molécules pures et en mélange au sein d'extraits végétaux permettrait d'améliorer notre connaissance relative aux phénomènes de synergie et d'antagonisme. Dans ce contexte, la mise en œuvre de la méthode CAT en système émulsionné semble particulièrement bien adaptée à ce type d'étude, puisque ces effets apparaissent majoritairement dans des milieux hétérogènes où les antioxydants se distribuent dans des compartiments différents en fonction de leur polarité.

Enfin dans une dernière partie, les propriétés antioxydantes et cytotoxiques de composés phénoliques ont été testées sur des lignées cellulaires de fibroblastes humains caractérisées

par une production endogène accrue d'espèces oxydantes d'origine mitochondriale. L'utilisation d'une sonde fluorogénique, la 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine-diacétate, nous a permis de mesurer la modulation du stress oxydant induite par l'exposition de ces cellules à l'acide 5-caféoylquinique et de ses esters alkylés durant 24, 48 et 72 heures. Parmi ces molécules, le 5-caféoylquinat de dodécyle a exercé la plus forte inhibition du stress oxydant, à des concentrations et des durées d'exposition situées en dessous du seuil de cytotoxicité. L'hypothèse selon laquelle une longueur de chaîne alkyle de douze atomes de carbone permettrait un franchissement efficace de la membrane a été avancée pour expliquer ces résultats. Par ailleurs, l'analyse de ces composés phénoliques en système modèle de type DPPH et CAT a montré que seule cette dernière permettait d'obtenir des résultats proches de ceux obtenus sur culture cellulaire, avec un maximum d'activité pour le 5-caféoylquinat de dodécyle. Le fait que la même tendance ait été observée pour le système CAT et en cultures cellulaires suggère d'ailleurs que le même mécanisme fondamental soit à l'origine de l'effet *cut-off* enregistré dans les deux systèmes considérés.

En termes de perspectives, les prolongements de ce travail pourraient, dans un premier temps, concerner une meilleure compréhension du comportement de ces molécules dans un milieu pluri-compartmenté comme les cellules en culture. Une connaissance accrue de leur localisation dans l'environnement cellulaire ou extracellulaire, permettrait de cibler les antioxydants sur des sites d'action particuliers comme par exemple les mitochondries, le cytosol ou encore les membranes cellulaires. Dans ce but, le marquage isotopique de composés phénoliques, associé à des méthodes de centrifugation différentielle et à l'utilisation de sondes fluorogéniques spécifiques d'un compartiment cellulaire particulier, pourraient constituer un outil d'investigation permettant d'étudier l'internalisation, le mode d'action et la métabolisation de ce type d'antioxydant.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

AFNOR. Corps gras d'origine animale et végétale. Détermination de la composition des acides gras en position 2 : Corps gras, graines oléagineuses, produits dérivés - Tome 1 : Corps gras et produits dérivés. *AFNOR NF T60-241: Paris 1993, 115-121.*

AFNOR. Corps gras d'origine animale et végétale. Préparation des esters méthyliques d'acides gras : Corps gras, graines oléagineuses, produits dérivés - Tome 1 : Corps gras et produits dérivés. *AFNOR NF T60-203: Paris 1993, 83-92.*

AFNOR. Corps gras d'origine animale et végétale. Détermination de la teneur en tocophérols et tocotriénols : Corps gras, graines oléagineuses, produits dérivés - Tome 1 : Corps gras et produits dérivés. *AFNOR 9936 : Paris 1997, 1-10.*

Ahmad MS, Fazal F, Rahman A, Hadi SM, Parish JH. Activities of flavonoids for the cleavage of DNA in the presence of Cu(II): Correlation with generation of active oxygen species. *Carcinogenesis 1992, 13, 605-608.*

Alía M, Mateos R, Ramos S, Lecumberri E, Bravo L, Goya L. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defence system of a human hepatoma cell line (HepG2). *Eur J Nutr 2006, 45, 19-28.*

Aldini G, Yeum K-J, Russel RM, Krinsky NI. A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. *Free Radic Biol Med 2001, 31, 1043-1050.*

Almajano MP, Gordon MH. Synergistic effect of BSA on antioxidant activities in model food emulsions. *J Am Oil Chem Soc 2004, 81, 275-280.*

Amer J, Goldfarb A, Fibach E. Flow cytometric analysis of the oxidative status of normal and thalassemic red blood cells. *Cytom Part A 2004, 60A, 73-80.*

Amiot MJ, Fleuriet A, Macheix JJ. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *J Agric Food Chem 1986, 34, 823-826.*

Ando Y, Brannstrom T, Uchida K, Nyhlin N, Nasman B, Suhr O, Yamashita T, Olsson T, El Salhy M, Uchino M, Ando M. Histochemical detection of 4-hydroxynonenal protein in Alzheimer amyloid. *J Neurol Sci 1998, 156, 172-176.*

Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, Mc Donald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst 2002, 127, 183-198.*

Antunes F, Cadenas E. Estimation of H₂O₂ gradient across biomembranes. *FEBS Lett 2000, 475, 121-126.*

Bacot S, Bernoud-Hubac N, Baddas N, Chantegrel B, Deshayes C, Doutheau A, Lagarde M, Guichardant M. Covalent binding of hydroxy-alkenals 4-HDDE, 4-HHE, and 4-HNE to ethanolamine phospholipid subclasses. *J Lipid Res* **2003**, *44*, 917-926.

Balgavy P, Devinsky F. Cut-off effects in biological activities of surfactants. *Adv Colloid Interface Sci* **1996**, *66*, 23-63.

Ball BA, Vo A. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY^{581/591}. *J Androl* **2002**, *23*, 259-269.

Barja G. Mitochondrial free radical generation: sites of production in states 4 and 3, organ specificity and relationship with aging rate. *J Bioenerg Biomembr* **1999**, *31*, 347-366.

Beaudeux JL, Vasson M-P. Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène. In : Delattre, J., Beaudeux, J-L., Bonnefont-Rousselot, D. eds. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Paris : *Lavoisier*, **2005**, 45-86.

Becker EM, Nissen LR, Skibsted LH. Antioxidant evaluation protocols: food quality or health effects. *Eur Food Res Technol* **2004**, *219*, 561-571.

Beltran E, Pla R, Yuste J, Mor-Mur M. Use of antioxidants to minimize rancidity in pressurized and cooked chicken slurries. *Meat Sci* **2004**, *66*, 719-725.

Benavente-Garcia O, Castillo J, Lorente J, Ortuño A, Del Rio JA. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem* **2000**, *68*, 457-462.

Benda C. Weitere Mitteilungen über die Mitochondria. *Verh Dtsch Physiol Ges* **1898**, 376-383.

Bendich A, D'Apolito P, Gabriel E. Interaction of dietary vitamin C and vitamin E on guinea pig immune responses to mitogens. *J Nutr* **1984**, *114*, 1588-1593.

Beppu M, Murakami K, Kikugawa K. Detection of oxidized lipid-modified erythrocyte membrane proteins by radiolabeling with tritiated borohydride. *Biochim Biophys Acta* **1987**, *897*, 169-179.

Beretta G, Aldini G, Maffei Facino R, Russel RM, Krinsky NI, Yeum K-J. Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. *Anal Biochem* **2006**, *354*, 290-298.

Bernards MA. Demystifying suberin. *Can J Bot* **2002**, *80*, 227-240.

Bernheim F, Bernheim MLC, Wilbur KM. The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipids. *J Biol Chem* **1947**, *174*, 257-264.

Berset C. Antioxydants phénoliques – Structure, propriétés, sources végétales. In : Sarni-Manchado, P., Cheynier, V. eds. Les polyphénols en agroalimentaire. Paris : *Lavoisier*, **2006**, 265-294.

Berset C, Cuvelier M-E. Méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant. *Sci Aliments* **1996**, *16*, 219-245.

- Birnie CR, Malamud D, Schnaare RL.** Antimicrobial evaluation of N-alkyl betaines and N-alkyl-N,N-dimethylamine oxides with variations in chain length. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**, 44, 2514-2517.
- Blois MS.** Antioxidant determination by the use of a stable radical. *Nature* **1958**, 181, 1199-2000.
- Bodamyali T, Stevens CR, Blake DR, Winyard PG.** Reactive oxygen/nitrogen species and acute inflammation: a physiological process. In : Free Radicals and Inflammation, 1 st ed., Winyard PG, Blake DR, Evans CH. Eds., Birkhauser: Basel, **2000**, 11-19.
- Bonanome A, Biasa F, De Luca M, Munaretto G, Biffanti S, Pradella M, Pagnan A.** n-3 fatty acids do not enhance LDL susceptibility to oxidation in hypertriacylglycerolemic hemodialyzed subjects. *Am J Clin Nutr* **1996**, 63, 261-266.
- Bonnefont-Rousselot D, Beaudoux J-L, Delattre J.** Oxydation des acides aminés et des protéines. In : Delattre, J., Beaudoux, J-L., Bonnefont-Rousselot, D. eds. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Paris : Lavoisier, **2005**, 45-86.
- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M.** Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* **1990**, 186, 343-355.
- Bose B, Chatterjee SN.** Effect of UV-A on the linoleic acid micelles. *Radiat Res* **1993**, 133, 340-344.
- Bouaziz M, Sayadi S.** Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree. *Eur J Lipid Sci Technol* **2005**, 107, 497-504.
- Boveris A, Chance B.** The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* **1973**, 134, 707-716.
- Boveris A, Oshino N, Chance B.** The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* **1972**, 128, 617-630.
- Brambilla G, Cajelli E, Canonero R, Martelli A, Marinari UM.** Mutagenicity in V79 chinese hamster cells of n-alkanals produced by lipid peroxidation. *Mutagenesis* **1989**, 4, 277-9.
- Bramley PM, Elmadfa I, Kafatos A, Kelly FJ, Manios Y, Roxborough HE, Schuch W, Sheehy PJA, Wagner K-H.** Vitamin E. *J Sci Food Agric* **2000**, 80, 913-938.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol* **1995**, 28, 25-30.
- Brauer RW, Steadman LT.** The autoxidation of β -eleostearic acid. The application of the spectrophotometer to the study of the course and kinetics of the reaction. *J Am Chem Soc* **1944**, 66, 563-569.
- Brude IR, Drevon CA, Hjermann I, Seljeflot I, Lund-Katz S, Saarem K, Sandstad B, Solvoll K, Halvorsen B, Arnesen H, Nenseter MS.** Peroxidation of LDL from combined-hyperlipidemic male smokers supplied with omega-3 fatty acids and antioxidants. *Arterio Thromb Vasc Biol* **1997**, 17, 2576-2588.

Brunton NP, Cronin DA, Monahan FJ, Durcan RA. Comparison of solid-phase microextraction (SPME) fibres for measurement of hexanal and pentanal in cooked turkey. *Food Chem* **2000**, 68, 339-345.

Burkitt MJ, Wardman P. Cytochrome *c* is a potent catalyst of dichlorofluorescein oxidation: Implications for the role of reactive oxygen species in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**, 282, 329-333.

Burton GW, Ingold KU. Autoxidation of biological molecules. 1. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *J Am Chem Soc* **1981**, 103, 6472-6477.

Burton GW, Ingold KU. β -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* **1984**, 224, 569-573.

Burton GW, Wronska U, Stone L, Foster DO, Ingold KU. Biokinetics of dietary RRR- α -tocopherol in the male guinea pig at three dietary levels of vitamin C and two levels of vitamin E. Evidence that vitamin C does not "spare" vitamin E in vivo. *Lipids* **1990**, 25, 199-210.

C

Calingasan NY, Uchida K, Gibson GE. Protein-bound acrolein: a novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **1999**, 72, 751-756.

Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med* **1993**, 14, 303-311.

Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* **1997**, 22, 749-760.

Cao G, Booth SL, Sadowski JA, Prior RL. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am J Clin Nutr* **1998**, 68, 1081-7.

Carter WO, Narayanan PK, Robinson JP. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J. Leukocyte Biol.* **1994**, 55, 253-258.

Cartron E, Carbonneau MA, Fouret G, Descomps B, Leger CL. Specific antioxidant activity of caffeoyl derivatives and other natural phenolic compounds: LDL protection against oxidation and decrease in the proinflammatory lysophosphatidylcholine production. *J Nat Prod* **2001**, 64, 480-486.

Cavin A, Hostettmann K, Dyatmiko W, Potterat O. Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. *Planta Med* **1998**, 64, 393-396.

Chaillou LL, Nazareno MA. New method to determine antioxidant activity of polyphenols. *J Agric Food Chem* **2006**, 54, 8397-8402.

Chapman RA, Mackay K. The estimation of peroxides in fats and oils by the ferric thiocyanate method. *J Am Oil Chem Soc* **1949**, 26, 360-363.

Chen LH, Lee MS, Hsing WF, Chen SH. Effect of vitamin C on tissue antioxidant status of vitamin E deficient rats. *Int J Vit Nutr Res* **1980**, 50, 156-162.

- Cheyrier V.** Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr* **2005**, *81* (suppl), 223S-229S.
- Chio KS, Tappel AL.** Synthesis and characterization of the fluorescent products derived from malonaldehyde and amino acids. *Biochemistry* **1969 a**, *8*, 2821-2826.
- Chio KS, Tappel AL.** Inactivation of ribonuclease and other enzymes by peroxidizing lipids and by malonaldehyde. *Biochemistry* **1969 b**, *8*, 2827-2832.
- Chipault JR.** Antioxidants for food use. In : Autoxidation and antioxidants. Lundberg WO. (eds), New York : Wiley, **1962**, 477-542.
- Chung WY, Benzie IFF.** Probe-assisted flow cytometric analysis of erythrocyte membrane response to site-specific oxidant stress. *Cytometry* **2000**, *40*, 182-188.
- Cillard J, Cillard P.** Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Ol Corps Gras Lipides* **2006**, *13*, 24-29.
- Clifford MN, Johnston KL, Knight S, Kuhnert N.** Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. *J Agric Food Chem* **2003**, *51*, 2900-2911.
- Collins TJ, Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD.** Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J* **2002**, *21*, 1616-1627.
- Combe N.** Les techniques d'analyse de l'oxydation lipidique. *Ol Corps Gras Lipides* **1996**, *3*, 200-204.
- Corbisier P, Remacle J.** Involvement of mitochondria in cell degeneration. *Eur J Cell Biol* **1990**, *51*, 173-182.
- Corbisier P, Remacle J.** Influence of the energetic pattern of mitochondria in cell ageing. *Mech Ageing Dev* **1993**, *71*, 47-58.
- Corongiu FP, Milla A.** An improved and simple method for determining diene conjugation in autoxidized fatty acids. *Chem Biol Interact* **1983**, *44*, 289-297.
- Corongiu FP, Banni S.** Detection of conjugated dienes by second derivative ultraviolet spectrophotometry. *Methods Enzymol* **1994**, *233*, 303-310.
- Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Van Den Berghe D.** Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxyde scavengers. *J Nat Prod* **1998**, *61*, 71-76.
- Cournet C, Collin S.** Effect of the number of flavanol units on the antioxidant activity of procyanidin fractions isolated from chocolate. *J Agric Food Chem* **2003**, *51*, 6816-6822.
- Cuendet M, Hostettmann K, Potterat O, Dyatmiko W.** Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helv Chim Acta* **1997**, *80*, 1144-1152.
- Cuvelier M-E, Berset C, Richard H.** Use of a new test for determining comparative antioxidative activity of BHA, BHT, alpha- and gamma-tocopherols and extracts from rosemary and sage. *Sci Aliments* **1990**, *10*, 797-806.
- Cuvelier ME, Bondet V, Berset C.** Behavior of phenolic antioxidants in a partitioned medium: Structure-activity relationship. *J Am Oil Chem Soc* **2000**, *77*, 819-823.

Cuvelier M-E, Maillard M-N. Comment évaluer l'efficacité des antioxydants alimentaires ? *Sci Alim* **2007**, 27, 259-282

D

Dahle LK, Hill EG, Holman RT. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch Biochem Biophys* **1962**, 98, 253-61.

Dangles O, Dufour C, Brett S. Flavonol-serum albumin complexation. Two-electron oxidation of flavonols and their complexes with serum albumin. *J Chem Soc Perkin Trans 2* **1999a**, 737-744.

Dangles O, Fargeix G, Dufour C. One-electron oxidation of quercetin and quercetin derivatives in protic and non protic media. *J Chem Soc Perkin Trans 2* **1999b**, 1387-1395.

Dangles O. Propriétés chimiques des polyphénols. In: Sarni-Manchado P, Cheynier V. eds. Les polyphénols en agroalimentaire. Paris : *Lavoisier*, **2006**, 29-54.

De Arcangelis V, Coletti D, Canato M, Molinaro M, Adamo S, Reggiani C, Naro F. Hypertrophy and transcriptional regulation induced in myogenic cell line L6-C5 by an increase of extracellular calcium. *J Cell Phys* **2005**, 202, 787-795.

Decker EA, Warner K, Richards MP, Shahidi F. Measuring antioxidant effectiveness in food. *J Agric Food Chem* **2005**, 53, 4303-4310.

Defrancesco F, Defrancesco C, Boccardi A. Oxidative alteration of lipids and UV absorption. UV spectra of oxidized structures by derivative technique. *Riv Ital Sostanze Grasse* **1980**, 57, 85-87.

De Hingh YCM, Meyer J, Fischer JC, Berger R, Smeitink JAM, Op Den Kamp JAF. Direct measurement of lipid peroxidation in submitochondrial particles. *Biochemistry* **1995**, 34, 12755-12760.

Delattre J, Thérond P, Bonnefont-Rousselot D. Espèces réactives de l'oxygène, antioxydants et vieillissement. In : Delattre, J., Beaudeux, J-L., Bonnefont-Rousselot, D. eds. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Paris : *Lavoisier*, **2005**, 45-86.

del Castillo MD, Gordon MH, Ames JM. Peroxyl radical-scavenging activity of coffee brews. *Eur Food Res Technol* **2005**, 221, 471-477.

De Leonardis A, Aretini A, Alfano G, Macciola V, Ranalli G. Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea Europaea* L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *Eur Food Res Technol* **2008 a**, 226, 653-659.

De Leonardis A, Pizzella L, Macciola V. Evaluation of chlorogenic acid and its metabolites as potential antioxidants for fish oils. *Eur J Lipid Sci Technol* **2008 b**, in press.

Devinsky F, Kopecka-Leitmanova A, Sersen F, Balgavy P. Cut-off effect in antimicrobial activity and in membrane perturbation efficiency of the homologous series of N, N-dimethylamine oxides. *J Pharm Pharmacol* **1990**, 42, 790-794.

- Dianov GL, Souza-Pinto N, Nyaga SG, Thybo T, Stevnsner T, Bohr VA.** Base excision repair in nuclear and mitochondrial DNA. *Progr Nucleic Acid Res Mol Biol* **2001**, 68, 285-297.
- Diaz G, Liu S, Isola R, Diana A, Falchi AM.** Mitochondrial localization of reactive oxygen species by dihydrofluorescein probes. *Histochem Cell Biol* **2003**, 120, 319-325.
- Dickinson E, McClements DJ.** Advances in food colloids. In : London : *Chapman & Hall*, **1995**, pp. 333.
- Dillard C, Tappel AL.** Fluorescent products from reaction of peroxidizing polyunsaturated fatty acids with phosphatidyl ethanolamine and phenylalanine. *Lipids* **1973**, 8, 183-189.
- Di Mascio P, Devasagayam TP, Kaiser S, Sies H.** Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers. *Biochem Soc Trans* **1990**, 18, 1054-1056.
- Dinis TCP, Almeida LM, Madeira VMC.** Lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum membranes: effect on functional and biophysical properties. *Arch Biochem Biophys* **1993**, 301, 256-264.
- Doleschall F, Kemény Z, Recseg K, Kóvári K.** A new analytical method to monitor lipid peroxidation during bleaching. *Eur J Lipid Sci Technol* **2002**, 104, 14-18.
- Dosanjh MK, Chenna A, Kim E, Fraenkel-Conrat H, Samson L, Singer B.** All four known cyclic adducts formed in DNA by the vinyl chloride metabolite chloroacetaldehyde are release by a human DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci USA* **1994**, 91, 1024-1028.
- Drummen GPC, Op Den Kamp JAF, Post JA.** Validation of the peroxidative indicators, *cis*-parinaric acid and parinaroyl-phospholipids, in a model system and cultured cardiac myocytes. *Biochim Biophys Acta* **1999**, 1436, 370-382.
- Drummen GPC, Gadella BM, Post JA, Brouwers JF.** Mass spectrometric characterization of the oxidation of the fluorescent lipid peroxidation reporter molecule C11-BODIPY^{581/591}. *Free Radic Biol Med* **2004**, 36, 1635-1644.

E

- Emaus RK, Grunwald R, Lemasters JJ.** Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: Spectral and metabolic properties. *Biochim Biophys Acta* **1986**, 850, 436-448.
- Erben Russ M, Michel C, Bors W, Saran M.** Absolute rate constants of alkoxyl radical reactions in aqueous solution. *J Phys Chem* **1987**, 91, 2362-2365.
- Erhardt JG, Mack H, Sobeck U, Biesalski HK.** β -carotene and α -tocopherol concentration and antioxidant status in buccal mucosal cells and plasma after oral supplementation. *Br J Nutr* **2002**, 87, 471-475.
- Esterbauer H.** Aldehydic products of lipid peroxidation. In: *Free radicals, lipid peroxidation and cancer*, McBrien DCH, Slater TF eds. London : *Academic Press*, **1982**, 101-128.
- Esterbauer H.** Lipid peroxidation products: formation, chemical properties and biological activities. In: *Free radicals in liver injury*, G Poli, KH Cheeseman, MU Dianzani, TF Slater, eds. Oxford : *IRL Press*, **1985**, 29-47.

Esterbauer H, Koller E, Snee RG, Koster JF. Possible involvement of the lipid-peroxidation product 4-hydroxynonenal in the formation of fluorescent chromolipids. *Biochem J* **1986 a**, 239, 405-409.

Esterbauer H, Benedetti A, Lang J, Fulceri R, Fauler G, Comporti M. Studies on the mechanism of formation of 4-hydroxynonenal during microsomal lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* **1986 b**, 876, 154-166.

Esterbauer H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J Clin Nutr* **1993 a**, 57 (suppl.), S779-S786.

Esterbauer H, Wäg G, Puhl H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Brit Med Bull* **1993 b**, 49, 566-576.

Eymard S, Genot C. A modified xylenol orange method to evaluate formation of lipid hydroperoxides during storage and processing of small pelagic fish. *Eur J Lipid Sci Technol* **2003**, 105, 497-501.

F

Fabbri A, Galaverna G, Ganino T. Polyphenol composition of olive leaves with regard to cultivar, time of collection and shoot type. *Acta Hort (ISHS)* **2008**, 791, 459-464.

Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **2002**, 18, 872-879.

Favier A. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique* **2003**, 108-115.

Fenton HJH. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc Trans* **1894**, 65, 899-911.

Fogelman AM, Schecter I, Seager J, Hokom M, Child JS, Edwards PA. Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **1980**, 77, 2214-2218.

Forsberg L, de Faire U, Morgenstern R. Oxidative stress, human genetic variation, and disease. *Arch Biochem Biophys* **2001**, 389, 84-93.

Foti M, Piattelli M, Baratta MT, Ruberto G. Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure-activity relationship. *J Agric Food Chem* **1996**, 44, 497-501.

Frankel EN. Lipid oxidation. Dundee : *The Oily Press*, **1998**.

Frankel EN, Hu ML, Tappel AL. Rapid headspace gas chromatography of hexanal as a measure of lipid peroxidation in biological samples. *Lipids* **1989**, 24, 976-981.

Frankel EN, Meyer AS. The problems of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J Sci Food Agric* **2000**, 80, 1925-1941.

Frankel EN, Finley JW. How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *J Agric Food Chem* **2008**, 56, 4901-4908.

Friguet B, Szweda LI. Inhibition of the multi-catalytic proteinase (proteasome) by 4-hydroxy-2-nonenal cross-linked protein. *FEBS Lett* **1997**, 405, 21-25.

Friguet B. Aging at the cellular and molecular levels and future perspectives. *L'actualité Chimique* **2003**, 103-107.

Fu M-X, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR. The advanced glycation end product, N ϵ -(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J Biol Chem* **1996**, 271, 9982-9986.

G

Gardès-Albert M, Jore A. Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène. In : Delattre, J., Beaudeau, J-L., Bonnefont-Rousselot, D. eds. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Paris : *Lavoisier*, **2005**, 45-86.

Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status : critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* **2000**, 11, 1106-1114.

Gillam AE, Heilbron IM, Hilditch TP, Morton RA. Spectrographic data of natural fats and their fatty acids in relation to vitamin A. *Biochem J* **1931**, 25, 30-38.

Glavind J, Holmer G. Thin-layer chromatographic determination of antioxidants by the stable free radical α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl. *J Am Oil Chem Soc* **1967**, 44, 539-542.

Glazer AN. Fluorescence-based assay for reactive oxygen species: A protective role for creatinine. *FASEB J* **1988**, 2, 2487-2491.

Glazer AN. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Methods Enzymol* **1990**, 186, 161-168.

Glebska J, Koppenol WH. Peroxynitrite-mediated oxidation of dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine. *Free Radic Biol Med* **2003**, 36, 676-682.

Golumbic C, Mattil HA. Antioxidants and the autoxidation of fats. XIII. The antioxygenic action of ascorbic acid in association with tocopherols, hydroquinones and related compounds. *J Am Chem Soc* **1941**, 63, 1279-1280.

Gomes A, Fernandes E, Lima JLFC. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods* **2005**, 65, 45-80.

Gonzalez M, Zarzuelo A, Gamez MJ, Utrilla MP, Jimenez J, Osuna I. Hypoglycemic activity of olive leaf. *Planta Med* **1992**, 58, 513-515.

Goodridge CF, Beaudry RM, Pestka JJ, Smith DM. Solid-phase microextraction-gas chromatography for quantifying hexanal above freeze-dried chicken myofibrils. *J Agric Food Chem* **2003**, 51, 4185-4190.

Gordoa JCR, Renobales M, Cerro A, Labastida EF, Amiano P, Dorronsoro M. Habitual fish intake is associated with decreased LDL susceptibility to *ex vivo* oxidation. *Lipids* **2002**, 37, 333-341.

Görlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R. A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res* **2000**, 87, 26-32.

Goupy P, Dufour C, Loonis M, Dangles O. A quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *J Agric Food Chem* **2003**, 51, 615-622.

Goupy P, Vulcain E, Caris-Veyrat C, Dangles O. Dietary antioxidant as inhibitors of the heme-induced peroxidation of linoleic acid: Mechanism of action and synergism. *Free Radic Biol Med* **2007**, 43, 933-946.

Grandemange S. Bases moléculaires de l'induction de la transformation des fibroblastes du derme humain après surexpression du recepteur mitochondrial de la triiodothyronine. *Thèse de doctorat* **2005**, Montpellier, pp. 150 .

Greene EL, Velarde V, Jaffa AA. Role of reactive oxygen species in bradykinin-induced mitogen-activated protein kinase and c-fos induction in vascular cells. *Hypertension* **2000**, 35, 942-947.

H

Haag-Liautard C, Coffey N, Houle D, Lynch M, Charlesworth B, Keightley PD. Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology* **2008**, 6, 1706-1714.

Haber F, Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc Roy Soc* **1934**, A147, 332-351.

Haberland ME, Fogelman AM, Edwards PA. Specificity of receptor-mediated recognition of malondialdehyde-modified low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **1982**, 79, 1712-1716.

Haberland ME, Olch CL, Fogelman AM. Role of lysines in mediating interaction of modified low density lipoproteins with the scavenger receptor of human monocyte macrophages. *J Biol Chem* **1984**, 259, 11305-11311.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford : *Oxford University Press*, **1989**.

Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun* **1990**, 9, 1-32.

Halliwell B, Gutteridge JMC. The definition and measurement of antioxydants in biological systems. *Free Radic Biol Med* **1995**, 18, 125-126.

Halpner AD, Handelman GJ, Belmont CA, Harris JM, Blumberg JB. Protection by vitamin C of oxidant-induced loss of vitamin E in rat hepatocytes. *J Nutr Biochem* **1998**, 9, 355-359.

Hanbury D. On the febrifuge properties of the olive (*Olea europea*, L.). *Pharmaceut J Provincial Trans* **1854**, 353-354.

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **1956**, 11, 298-300.

Harman D. The biological clock: the mitochondria ? *J Am Geriatr Soc* **1972**, 20, 145-147.

- Haugland RP.** Handbook of fluorescent probes. Eugene : *Molecular Probes, Inc*, **1996**, 297-298.
- Heath RL, Tappel AL.** A new sensitive assay for the measurement of hydroperoxides. *Anal Biochem* **1976**, 76, 184-191.
- Heimler D, Cimato A, Alessandri S, Sani G, Pieroni A.** Seasonal trend of flavonoids in olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Agr Med* **1996**, 126, 205-209.
- Heinonen IM, Lehtonen PJ, Hopia AI.** Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. *J Agric Food Chem* **1998**, 46, 25-31.
- Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM.** Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* **1999**, 27, 146-159.
- Hidalgo FJ, Zamora R.** Fluorescent pyrrole products from carbonilo-amine reactions. *J Biol Chem* **1993**, 268, 16190-16197.
- Hidalgo E, Domínguez C.** Study of cytotoxicity mechanism of silver nitrate in human dermal fibroblasts. *Toxicology Letters* **1998**, 169-179.
- Higdon JV, Du SH, Lee YS, Wu T, Wander RC.** Supplementation of postmenopausal women with fish oil does not increase overall oxidation of LDL *ex vivo* compared to dietary oils rich in oleate and linoleate. *J Lipid Res* **2001**, 42, 407-418.
- Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O, Kondo K.** Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH[•] radicals and LDL oxidation. *J Nutr Sci Vitaminol* **2001**, 47, 357-362.
- Hockberger PE, Skimina TA, Centonze VE, Lavin C, Chu S, Dadras S, Reddy JK, White JG.** Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H₂O₂ in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **1999**, 96, 6255-6260.
- Holman RT, Lundberg WO, Burr GO.** Spectrophotometric studies of the oxidation of fats. III. Ultraviolet absorption spectra of oxidized octadecatrienoic acids. *J Am Chem Soc* **1945**, 67, 1390-1394.
- Holmes RL, Pack FC, Minor JC, McKinney RS.** The characteristics of domestic tung oils. *J Am Oil Chem Soc* **1954**, 31, 417-418.
- Hopkins CY, Chisholm MJ, Ogrodnick JA.** Identity and configuration of conjugated fatty acids in certain seed oils. *Lipids* **1969**, 4, 89-92.
- Howard JA.** in *Advances in Free Radical Chemistry* (Williams, G.H., ed.) London : *Logos Press*, **1972**, 49-173.
- Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK.** Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *J Agric Food Chem* **2002**, 50, 1815-1821.
- Huang D, Ou B, Prior RL.** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* **2005**, 53, 1841-1856.

Hutchinson F. The distance that a radical formed by ionizing radiation can diffuse in a yeast cell. *Radiat Res* **1957**, 7, 473-483.

Hyslop PA, Sklar LA. A quantitative fluorimetric assay for the determination of oxidant production by polymorphonuclear leukocytes: Its use in the simultaneous fluorimetric assay of cellular activation processes. *Anal Biochem* **1984**, 141, 280-286.

I

Inoue M, Suzuki R, Sakaguchi N, Li Z, Takeda T, Ogihara Y, Jiang B-Y, Chen Y. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. *Biol Pharm Bul* **1995**, 18, 1526-1530.

Ischiropoulos H, Gow A, Thom SR, Kooy NW, Royall JA, Crow J. Detection of reactive nitrogen species using 2,7-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123. *Methods Enzymol* **1999**, 301, 367-373.

Isler O, Rüegg R, Schwieter U. Carotenoids as food colourants. *Pure Appl Chem* **1965**, 14, 245-263.

Itakura K, Osawa T, Uchida K. Structure of a fluorescent compound from 4-hydroxy-2-nonenal and N α -hippuryllysine: a model for fluorophores derived from protein modifications by lipid peroxidation. *J Org Chem* **1998**, 63, 185-187.

Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T, Yankova T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *J Ethnopharm* **2005**, 96, 145-150.

J

Jacques PF, Halpner AD, Blumberg JB. Influence of combined antioxidant nutrient intakes on their plasma concentrations in an elderly population. *Am J Clin Nutr* **1995**, 62, 1228-1233.

Jamieson GS, Rose WG. The seed oil of *Garcia nutans*. *J Am Oil Chem Soc* **1943**, 20, 202-203.

Janero D. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* **1990**, 9, 515-540.

Jaruga P, Dizdaroglu M. Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acids Res* **1996**, 24, 1389-1394.

Jiang ZY, Hunt JV, Wolff SP. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxides in low density lipoproteins. *Anal Biochem* **1992**, 202, 384-389.

Jialal I, Grundy SM. Effect of combined supplementation with alpha-tocopherol, ascorbate, and beta carotene on low-density lipoprotein oxidation. *Circulation* **1993**, 88, 2780-6.

Jiang Y, Kusama K, Satoh K, Takayama E, Watanabe S, Sakagami H. Induction of cytotoxicity by chlorogenic acid in human oral tumor cell lines. *Phytomedicine* **2000**, 7, 483-491.

Jones P, Vogt T. Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* **2001**, 213, 164-174.

Jørgensen K, Skibsted LH. Carotenoid scavenging of radicals. Effect of carotenoid structure and oxygen partial pressure on antioxidative activity. *Z Lebensm Unters Forsch* **1993**, 196, 423-429.

Jovanovic SV, Steenken S, Hara Y, Simic MG. Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for the antioxidant activity ? *J Chem Soc Perkin Trans 2* **1996**, 11, 2497-2504.

K

Kanazawa K, Takeuchi S, Hasegawa R. Influence of ascorbic acid deficiency on the level of non-protein SH compounds and vitamin E in the blood and tissues of guinea pigs. *Nihon Univ J Med* **1981**, 23, 257-265.

Kano K, Mabuchi T, Uno B, Esaka Y, Tanaka T, Iinuma M. Superoxide anion radical-induced dioxygenolysis of quercetin as a mimic of quercetinase. *J Chem Soc Chem Commun* **1994**, 593-594.

Kansci G, Dongo E, Genot C. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) test demonstrates antiradical activity of *Dorstenia psilurus* and *Dorstenia ciliata* plant extracts. *Nahrung* **2003**, 47, 434-437.

Kawanishi S, Hiraku Y, Murata M, Oikawa S. The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* **2002**, 32, 822-832.

Kennedy TA, Liebler DC. Peroxyl radical scavenging by β -carotene in lipid bilayers. Effect of oxygen partial pressure. *J Biol Chem* **1992**, 267, 4658-4663.

Kikugawa K, Machida Y, Kida M, Kurachi T. Studies on peroxidized lipids. III. Fluorescent pigments derived from the reaction of malondialdehyde and amino acids. *Chem Pharm Bull* **1981**, 29, 3003-3011.

Kikugawa K, Ido Y. Studies on peroxidized lipids. V. Formation and characterization of 1,4-dihydropyridine-3,5-dicarbaldehydes as model of fluorescent components in lipofuscin. *Lipids* **1984 a**, 19, 600-608.

Kikugawa K, Ido Y, Mikami J. Studies on peroxidized lipids. VI. Fluorescent products derived from the reaction of primary amines, malondialdehyde and monofunctional aldehydes. *J Am Oil Chem Soc* **1984 b**, 61, 1574-1581.

Kim JH, Kim BG, Park Y, Ko JH, Lim CE, Lim J, Lim Y, Ahn J-H. Characterization of flavonoid 7-O-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem* **2006**, 70, 1471-1477.

Kohn HI, Liversedge N. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. *J Pharmacol Exp Ther* **1944**, 82, 292-300.

Koleva II, Van Beek TA, Linssen JPH, De Groot A, Evstatieva LN. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem Anal* **2001**, *13*, 8-17.

Krinsky NI. The antioxidant and biological properties of the carotenoids. *Ann N Y Acad Sci* **1998**, *854*, 443-447.

Kuypers FA, Van Den Berg JJM, Schalkwijk C, Roelofsen B, Op Den Kamp JAF. Parinaric acid as a sensitive fluorescent probe for the determination of lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* **1987**, *921*, 266-274.

L

Laguerre M, Mestres C, Davrieux F, Ringuet J, Boulanger R. Rapid discrimination of scented rice by solid-phase microextraction, mass spectrometry, and multivariate analysis used as a mass sensor. *J Agric Food Chem* **2007**, *55*, 1077-1083.

Lai S, Gray JJ, Booren AM, Crackel RL, Gill JL. Assessment of off-flavor development in restructured chicken nuggets using hexanal and TBARS measurements and sensory evaluation. *J Sci Food Agric* **1995**, *67*, 447-452.

Laranjinha JA, Almeida LM, Madeira VM. Lipid peroxidation and its inhibition in low density lipoproteins: quenching of *cis*-parinaric acid fluorescence. *Arch Biochem Biophys* **1992**, *297*, 147-154.

Laranjinha JA, Almeida LM, Madeira VM. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxyl radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochem Pharmacol* **1994**, *48*, 487-494.

Lea CH. The effect of light on the oxidation of fats. *Proc Roy Soc London* **1931**, *108*, 175-189.

Lee SH, Blair IA. Characterization of 4-oxo-2-nonenal as a novel product of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* **2000**, *13*, 698-702.

Lee K-J, Dabrowski K. Interaction between vitamins C and E affects their tissue concentrations, growth, lipid oxidation, and deficiency symptoms in yellow perch (*Perca flavescens*). *Br J Nutr* **2003**, *89*, 589-596.

Lee-Huang S, Zhang L, Huang PL, Chang Y-T, Huang PL. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1infection and OLE treatment. *Biochem Biophys Res Com* **2003**, *307*, 1029-1037.

Lien EJ, Ren S, Bui HH, Wang R. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radic Biol Med* **1999**, *26*, 285-294.

Locatelli C, Rosso R, Santos-Silva MC, de Souza CA, Licínio MA, Leal P, Bazzo ML, Yunes RA, Creczynski-Pasa TB. Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells. *Bioorg Med Chem* **2008**, *16*, 3791-3799.

López Giraldo LJ, Laguerre M, Lecomte J, Figueroa-Espinoza MC, Baréa B, Weiss J, Decker EA, Villeneuve P. Kinetic and stoichiometry of the reaction of chlorogenic acid and its alkyl esters against the DPPH radical. *J Agric Food Chem* **2009**, *57*, 863-870.

Lotito SB, Frei B. Dietary flavonoids attenuate tumor necrosis factor α -induced adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. Structure-function relationships and activity after first pass metabolism. *J Biol Chem* **2006**, 281, 37102-37110.

Luo Y-R, Holmes JL. The stabilization energies of polyenyl radicals. *Chem Phys Lett* **1994**, 228, 329-332.

M

Macheix JJ, Fleuriet A, Sarni-Manchado P. Composés phénoliques dans la plante – structure, biosynthèse, repartition et rôles. In: Sarni-Manchado P, Cheynier V, editors. Les polyphénols en agroalimentaire. Paris : *Lavoisier*, **2006**, 1-28.

Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta* **2008**, 613, 1-19.

Maiorino M, Zamburlini A, Roveri A, Ursini F. Prooxidant role of vitamin E in copper induced lipid peroxidation. *FEBS Lett* **1993**, 330, 174-176.

Makrigiorgos GM, Kassis AI, Mahmood A, Bump EA, Savvides P. Novel fluorescein-based flow-cytometric method for detection of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* **1997**, 22, 93-100.

Manach C, Scalbert A, Remesy C, Morand C. Consommation et biodisponibilité des polyphénols. In: Sarni-Manchado P, Cheynier V, editors. Les polyphénols en agroalimentaire. Paris : *Lavoisier*, **2006**, 361-390.

Mantle D, Anderton JG, Falkous G, Barnes M, Jones P, Perry EK. Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **1998**, 121, 385-391.

Marco GL. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* **1968**, 45, 594-598.

Margulis L. Origin of eukaryotic cells. New Haven : *Yale University Press*, **1970**.

Margulis L, Sagan D. L'univers bactériel. Paris : *Éditions du Seuil*, **2002**, 135-144.

Markin D, Duek L, Berdicevsky I. *In vitro* antimicrobial activity of olive leaves. *Mycoses* **2003**, 46, 132-136.

Maulik G, Kassis AI, Savvides P, Makrigiorgos GM. Fluoresceinated phosphoethanolamine for flow-cytometric measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* **1998**, 26, 645-653.

McCay PB. Vitamine E : Interactions with free radicals and ascorbate. *Ann Rev Nutr* **1985**, 5, 323-340.

McClements DJ, Decker EA. Lipid emulsion in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *J Food Sci* **2000**, 65, 1270-1282.

McGuire SO, James-Kracke MR, Sun GY, Fritsche KL. An esterification protocol for *cis*-parinaric acid-determined lipid peroxidation in immune cells. *Lipids* **1997**, 32, 219-226.

Mezzetti A, Lapenna D, Pierdomenico SD, Calafiore AM, Costantini F, Riariosforza G, Imbastaro T, Neri M, Cuccurullo F. Vitamins E, C, and lipid peroxidation in plasma and arterial tissue of smokers and non-smokers. *Atherosclerosis* **1995**, *112*, 91-99.

Mihaljevic B, Katusin-Razem B, Razem D. The reevaluation of the ferric thiocyanate assay for lipid hydroperoxides with special considerations of the mechanistic aspects of the response. *Free Radic Biol Med* **1996**, *21*, 53-63.

Miller HE. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* **1971**, *48*, 91.

Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)* **1993**, *84*, 407-412.

Miura YH, Tomita I, Watanabe T, Hirayama T, Fukui S. Active oxygens generation by flavonoids. *Biol Pharm Bull* **1998**, *21*, 93-96.

Mlakar A, Spiteller G. Previously unknown aldehydic lipid peroxidation compounds of arachidonic acid. *Chem Phys Lipids* **1996**, *79*, 47-53.

Mochizuki M, Yamazaki S-I, Kano K, Ikeda T. Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochim Biophys Acta* **2002**, *1569*, 35-44.

Morgan CG, Hudson B, Wolber PK. Photochemical dimerization of parinaric acid in lipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci USA* **1980**, *77*, 26-30.

Moridani MY, Scobie H, Jamshidzadeh A, Salehi P, O'Brien PJ. Caffeic acid, chlorogenic acid, and dihydrocaffeic acid metabolism: Glutathione conjugate formation. *Drug Metab Dispos* **2001**, *29*, 1432-1439.

Morikawa S, Kurauchi O, Tanaka M, Yoneda M, Uchida K, Itakura A, Furugori K, Mizutani S, Tomoda Y. Increased mitochondrial damage by lipid peroxidation in trophoblast cells of preeclamptic placentas. *Biochem Mol Biol Int* **1997**, *41*, 767-75.

Mortensen A, Skibsted LH. Reactivity of β -carotene towards peroxyl radicals studied by laser flash and steady-state photolysis. *FEBS Lett* **1998**, *426*, 392-396.

Moure A, Franco D, Sineiro J, Domínguez H, Núñez MJ, Lema JM. Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. *J Agric Food Chem* **2000**, *48*, 3890-3897.

Muggli R. Free radical tissue damage: the protective role of antioxidant nutrients. In : Conrongiu, F., Banni, S., Dessi, M. A., Rice-Evans, C., eds. Free Radical and Antioxidants in Nutrition. London : Richelieu Press **1993**, 189-204.

Murata-Kamiya N, Kamiya H, Iwamoto N, Kasai H. Formation of a mutagen, glyoxal, from DNA treated with oxygen free radicals. *Carcinogenesis* **1995**, *16*, 2251-2253.

Murata-Kamiya N, Kamiya H, Kaji H, Kasai H. Glyoxal, a major product of DNA oxidation, induces mutations at G:C sites on a shuttle vector plasmid replicated in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **1997**, *25*, 1897-1902.

Muruganandam A, Drouillard C, Thibert R, Cheung R, Draisey T, Mutus B. Glutathione metabolic enzyme activities in diabetic platelets as a function of glycemic control. *Thromb Res* **1992**, 67, 385-397.

N

Naguib YMA. A fluorometric method for measurement of peroxy radical scavenging activities of lipophilic antioxidants. *Anal Biochem* **1998**, 265, 290-298.

Naguib YMA. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J Agric Food Chem* **2000**, 48, 1150-1154.

Nègre-Salvayre A, Augé N, Duval C, Robbesyn F, Thiers J-C, Nazzari D, Benoist H, Salvayre R. Detection of intracellular reactive oxygen species in cultured cells using fluorescent probes. *Methods Enzymol* **2002**, 352, 62-71.

Niki E, Saito T, Kawakami A, Kamiya Y. Inhibition of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. *J Biol Chem* **1984**, 259, 4177-4182.

Niki E, Kawakami A, Yamamoto Y, Kamiya Y. Oxidation of lipids. VIII. Synergistic inhibition of oxidation of phosphatidylcholine liposome in aqueous dispersion by vitamin E and vitamin C. *Bull Chem Soc Jpn* **1985**, 58, 1971-1975.

Niki E, Noguchi N. Evaluation of antioxidant capacity. What capacity is being measured by which method ? *IUBMB Life* **2000**, 50, 323-329.

Nuchi CD, McClements DJ, Decker EA. Impact of Tween 20 hydroperoxides and iron on the oxidation of methyl linoleate and salmon oil dispersions. *J Agric Food Chem* **2001**, 49, 4912-4916.

O

Oe T, Arora JS, Lee SH, Blair IA. A novel lipid hydroperoxide-derived cyclic covalent modification to histone H4. *J Biol Chem* **2003**, 278, 42098-42105.

Ohyashiki T, Sakata N, Mohri T, Matsui K. Fluorescence characteristics of peroxidation products in porcine intestinal brush-border membranes. *Arch Biochem Biophys* **1991**, 284, 375-380.

Okamoto K, Toyokuni S, Uchida K, Ogawa O, Takenawa J, Kakehi Y, Kinoshita H, Hattori-Nakakuki Y, Hiai H, Yoshida O. Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer* **1994**, 58, 825-829

Osaka K, Ritov VB, Bernardo JF, Branch RA, Kagan VE. Amphotericin B protects *cis*-parinaric acid against peroxy radical-induced oxidation: amphotericin B as an antioxidant. *Antimicrob Agents Chemother* **1997**, 41, 743-747.

Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. *J Agric Food Chem* **2002**, 50, 3122-3128.

Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* **2001**, 49, 4619-4626.

Ozcelik B, Lee JH, Min DB. Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J Food Sci* **2003**, 68, 487-490.

P

Packer JE, Slater TF, Willson RL. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* **1979**, 278, 737-738.

Panizzi L, Scarpeti ML, Oriente EG. Structure of the bitter glucoside oleuropein. Note II. *Gazz Chim Ital* **1960**, 90, 1449-1485.

Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Eroas-Romero A, Saavedra G, Murcia MA, Jiménez AM, Codina C. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Sci* **2003**, 73, 1667-1681.

Parkes TL, Elia AJ, Dickinson D, Hilliker AJ, Phillips JP, Boulianne GL. Extension of Drosophila lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons. *Nature Genetics* **1998**, 19, 171-174.

Patil GS, Cornwell DG. Interfacial oxidation of α -tocopherol and the surface properties of its oxidation products. *J Lipid Res* **1978**, 19, 416-422.

Patton S, Kurtz GW. 2-Thiobarbituric acid as a reagent for detecting milk fat oxidation. *J Dairy Sci* **1951**, 34, 669-674.

Pedrielli P, Skibsted LH. Antioxidant synergy and regeneration effect of quercetin, (-)-epicatechin, and (+)-catechin on α -tocopherol in homogeneous solutions of peroxidizing methyl linoleate. *J Agric Food Chem* **2002**, 50, 7138-7144.

Pencreac'h G, Graille J, Pina M, Verger R. An ultraviolet spectrophotometric assay for measuring lipase activity using long-chain triacylglycerols from *Aleurites fordii* seeds. *Anal Biochem* **2002**, 303, 17-24.

Peyrat-Maillard M-N, Cuvelier ME, Berset C. Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: synergistic and antagonistic effects. *J Am Oil Chem Soc* **2003**, 80, 1007-1012.

Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* **2000**, 63, 1035-1042.

Portier P. Les symbiotes. Paris : Masson & Cie, Librairie de l'Académie de Médecine, **1918**, pp 315.

Possel H, Noack H, Augustin W, Keilhoff G, Wolf G. 2,7-Dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. *FEBS* **1997**, 416, 175-178.

Poubelle P, Chaintreuil J, Bensadoun J, Blotman F, Simon L, Crastes de Paulet A. Plasma lipoperoxides and aging. Critical assessment of the thiobarbituric acid method for the measurement of lipoperoxides and malondialdehyde. *Biomed Pharmacother* **1982**, 36, 164-166.

Pratt D, Miller E. A flavonoid antioxidant in spanish peanuts (*Arachia hypogoea*). *J Am Oil Chem Soc* **1984**, 61, 1064-1067.

Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* **1999**, 27, 1173-1181

Prior RL, Hoang HA, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. *J Agric Food Chem* **2003**, 51, 3273-3279.

Prior RL, Wu XL, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. *J Agric Food Chem* **2005**, 53, 4290-4302.

Pryor WA, Cornicelli JA, Devall LJ, Tait B, Trivedi BK, Witiak DT, Wu M. A rapid screening test to determine the antioxidant potencies of natural and synthetic antioxidants. *J Org Chem* **1993**, 58, 3521-3532.

Przestalski S, Sarapuk J, Kleszczynska H, Gabrielska J, Hladyszowski J, Trela Z, Kuczera J. Influence of amphiphilic compounds on membranes. *Acta Biochimica Polonica* **2000**, 47, 627-638.

Q

Qiu X, Takemura G, Koshiji M, Hayakawa Y, Kanoh M, Maruyama R, Ohno Y, Minatoguchi S, Akao S, Fukuda K, Fujiwara T, Fujiwara H. Gallic acid induces vascular smooth muscle cell death via hydroxyl radical production. *Heart Vessels* **2000**, 15, 90-99.

R

Rada M, Guinda A, Cayuela J. Solid/liquid extraction and isolation by molecular distillation of hydroxytyrosol from *Olea europaea* L. leaves. *Eur J Lipid Sci Technol* **2007**, 109, 1071-1076.

Rae T. Tolerance of mouse macrophages in vitro to barium sulfate used in orthopedic bone cement. *J Biomed Mater Res* **1977**, 11, 839-846.

Rahman A, Fazal F, Greensill J, Ainley K, Parish JH, Hadi SM. Strand scission in DNA induced by dietary flavonoids: Role of Cu(I) and oxygen free radicals and biological consequence of scission. *Mol Cell Biochem* **1992**, 111, 3-9.

Ramamoorthy R, Dutta PK, Akbar SA. Oxygen sensors: materials, methods, designs and applications. *J Mater Sci* **2003**, 38, 4271-4282.

Retsky KL, Freeman MW, Frei B. Ascorbic acid oxidation product(s) protect human low density lipoprotein against atherogenic modification. Anti- rather than prooxidant activity of vitamin C in presence of transition metal ions. *J Biol Chem* **1993**, 268, 1304-1309.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* **1996**, 20, 933-956.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* **1997**, 2, 152-159.

Richards CD, Martin K, Gregory S, Keightley CA, Hesketh TR, Smith GA, Warren GB, Metcalfe JC. Degenerate perturbations of protein structure as the mechanism of anaesthetic action. *Nature* **1978**, 276, 775-779.

Ritov VB, Banni S, Yalowich JC, Day BW, Claycamp HG, Corongiu FP, Kagan VE. Non-random peroxidation of different classes of membrane phospholipids in live cells detected by metabolically integrated *cis*-parinaric acid. *Biochim Biophys Acta* **1996**, 1283, 127-140.

Roginsky V, Barsukova T. Chain-breaking antioxidant capability of some beverages as determined by the Clark electrode technique. *J Med Food* **2001**, 4, 219-229.

Roginsky V, Lissi EA. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem* **2005**, 92, 235-254.

Roginsky V, Alegria AE. Oxidation of tea extracts and tea catechins by molecular oxygen. *J Agric Food Chem* **2005**, 53, 4529-4535.

Royall JA, Ischiropoulos H. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* **1993**, 302, 348-355.

Russo N, Toscano M, Uccella N. Semiempirical molecular modeling into quercetin reactive site: structural, conformational, and electronic features. *J Agric Food Chem* **2000**, 48, 3232-3237.

S

Sachidanandame K, Fagan SC, Ergul A. Oxidative stress and cardiovascular disease: antioxidants and unresolved issues. *Cardiovasc Drug Rev* **2005**, 23, 115-32.

Sagan L. On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* **1967**, 14, 225-274.

Sahu SC, Gray GC. Interactions of flavonoids, trace metals, and oxygen: Nuclear DNA damage and lipid peroxidation induced by myricetin. *Cancer Lett* **1993**, 70, 73-79.

Sahu SC, Gray GC. Kaempferol-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation. *Cancer Lett* **1994**, 85, 159-164.

Saito S, Okamoto Y, Kawabata J. Effects of alcoholic solvents on antiradical abilities of protocatechuic acid and its alkyl esters. *Biosci Biotechnol Biochem* **2004**, 68, 1221-1227.

Saito S, Kawabata J. Synergistic effects of thiols and amines on antiradical efficiency of protocatechuic acid. *J Agric Food Chem* **2004**, 52, 8163-8168.

Saito S, Kawabata J. Effets of electron-withdrawing substituents on DPPH radical scavenging reactions of protocatechuic acid and its analogues in alcoholic solvents. *Tetrahedron* **2005**, 61, 8101-8108.

Saito S, Kawabata J. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical-scavenging reactions of protocatechuic acid (3,4-dihydroxybenzoic acid): difference in reactivity between acids and their esters. *Helv Chim Acta* **2006**, 89, 1395-1407.

- Sakaguchi N, Inoue M, Ogihara Y.** Reactive oxygen species and intracellular Ca^{2+} , common signals for apoptosis induced by gallic acid. *Biochem Pharm* **1998**, 55, 1973-1981.
- Salvador A, Sousa J, Pinto RE.** Hydroperoxyl, superoxide and pH gradients in the mitochondrial matrix: a theoretical assessment. *Free Radic Biol Med* **2001**, 31, 1208-1215.
- Salvioli S, Bonafè M, Capri M, Monti D, Franceschi C.** Mitochondria, aging and longevity – a new perspective. *FEBS Lett* **2001**, 492, 9-13.
- Sanchez Ferrer A, Santema JS, Hilhorst R, Visser AJ.** Fluorescence detection of enzymatically formed hydrogen peroxide in aqueous solution and in reversed micelles. *Anal Biochem* **1990**, 187, 129-132.
- Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F.** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric* **1998**, 76, 270-276.
- Sánchez-Moreno C.** Review : methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Tech Int* **2002**, 8, 121-137.
- Sanchez-Moreno C, Cao G, Ou B, Prior RL.** Anthocyanin and proanthocyanidin content in selected white and red wines. Oxygen radical absorbance capacity comparison with nontraditional wines obtained from highbush blueberry. *J Agric Food Chem* **2003**, 51, 4889-4896.
- Santos RB, Simoes JAM.** Energetics of the O-H bond in phenol and substituted phenol: a critical evaluation of literature data. *J Phys Chem Ref Data* **1998**, 27, 707-739.
- Sastre J, Pallardó FV, Viña J.** The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radic Biol Med* **2003**, 35, 1-8.
- Sato K, Niki E, Shimasaki H.** Free radical-mediated chain oxidation of low density lipoprotein and its synergistic inhibition by vitamin E and vitamin C. *Arch Biochem Biophys* **1990**, 279, 402-405.
- Satué-Gracia MT, Heinonen M, Frankel EN.** Anthocyanins as antioxidant son human low-density lipoproteína and lecithin-liposome Systems. *J Agric Food Chem* **1997**, 45, 3362-3367.
- Schaur RJ, Zollner H, Esterbauer H.** Biological effects of aldehydes with particular attention to 4-hydroxynonenal and malonaldehyde. In: *Membrane lipid oxidation*, C Vigo-Pelfrey, ed. Vol.I. Boca Raton : *CRC Press*, **1991**, 41-63.
- Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Huang D, Owens J, Agarwal A, Jensen GS, Hart AN, Shanbrom E.** Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). *J Agric Food Chem* **2006**, 54, 8604-8610.
- Seeram NP, Aviram M, Zhang Y, Henning SM, Feng L, Dreher M, Heber D.** Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenols-rich beverages in the United States. *J Agric Food Chem* **2008**, 56, 1415-1422.
- Serrano A, Palacios C, Roy G, Cespón C, Villar ML, Nocito M, González-Porqué P.** Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. *Arch Biochem Biophys* **1998**, 350, 49-54.

- Sergent O, Morel I, Cogrel P, Chevanne M, Beaugendre M, Cillard M, Cillard P.** Ultraviolet and infrared spectroscopy for microdetermination of oxidized and unoxidized fatty acyl esters in cells. *Anal Biochem* **1993**, 211, 219-223.
- Sestili P, Guidarelli A, Dacha M, Cantoni O.** Quercetin prevents DNA single strand breakage and cytotoxicity caused by *tert*-butylhydroperoxide : free radical scavenging versus iron chelating mechanism. *Free Radic Biol Med* **1998**, 25, 196-200.
- Shahidi F, Yun J, Rubin LJ, Wood DF.** The hexanal content as an indicator of oxidative stability and flavour acceptability in cooked ground pork. *Can Inst Food Sci Technol* **1987**, 20, 104-106.
- Shibata N, Nagai R, Uchida K, Horiuchi S, Yamada S, Hirano A, Kawaguchi M, Yamamoto T, Sasaki S, Kobayashi M.** Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycoxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res* **2001**, 917, 97-104.
- Shibata N, Yamada S, Uchida K, Hirano A, Sakoda S, Fujimura H, Sasaki S, Iwata M, Toi S, Kawaguchi M, Yamamoto T, Kobayashi M.** Accumulation of protein-bound 4-hydroxy-2-hexenal in spinal cords from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res* **2004**, 1019, 170-177
- Shimasaki H, Hirai N, Ueta N.** Comparison of fluorescence characteristics of products of peroxidation of membrane phospholipids with those of products derived from reaction of malonaldehyde with glycine as a model of lipofuscin fluorescent substances. *J Biochem* **1988**, 104, 761-766.
- Shimasaki H.** Assay of fluorescent lipid peroxidation products. *Methods Enzymol* **1994**, 233, 338-346.
- Silva FAM, Borges F, Guimaraes C, Lima JLFC, Matos C, Reis S.** Phenolic acids and derivatives: Studies on the relationship among structure, radical scavenging activity, and physicochemical parameters. *J Agric Food Chem* **2000**, 48, 2122-2126.
- Silva EM, Souza JNS, Rogez H, Rees JF, Larondelle Y.** Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chem* **2007**, 101, 1012-1018.
- Simoes APCF, Van Den Berg JJM, Roelofsen B, Op Den Kamp JAF.** Lipid peroxidation in Plasmodium falciparum-parasitized human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* **1992**, 298, 651-657.
- Sklar LA, Hudson BS, Simoni RD.** Conjugated polyene fatty acids as membrane probes: Preliminary characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* **1975**, 72, 1649-1653.
- Sohal RS, Weindruch R.** Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* **1996**, 273, 59-63.
- Soler-Rivas C, Espín JC, Wichers HJ.** An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochem Anal* **2000**, 11, 330-338.
- Soler-Rivas C, Espin JC, Wichers HJ.** Oleuropein and related compounds. *J Sci Food Agric* **2000**, 80, 1013-1023

Son S, Lewis BA. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. *J Agric Food Chem* **2002**, 50, 468-472.

Solodovnik VD. Chemistry of natural aliphatic acids containing a conjugated system of double bonds. *Russian Chemical Reviews* **1967**, 36, 272-283.

Souza JNS, Silva EM, Loir A, Rees J-F, Rogez H, Larondelle Y. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological in vitro assays. *Food Chem* **2008**, 106, 331-339.

St Angelo AJ, Crippen KL, Dupuy HP, James C. Chemical and sensory studies of antioxidant-treated beef. *J Food Sci* **1990**, 55, 1501-1505.

Stadtman ER. Oxidation of free amino acids and amino acids residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* **1993**, 62, 797-821.

Steenbergen RGH, Drummen GPC, Op Den Kamp JAF, Post JA. The use of *cis*-parinaric acid to measure lipid peroxidation in cardiomyocytes during ischemia and reperfusion. *Biochim Biophys Acta* **1997**, 1330, 127-137.

Suzuki D, Miyata T, Saotome N, Horie K, Inagi R, Yasuda Y, Uchida K, Izuhara Y, Yagame M, Sakai H, Kurokawa K. Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesions. *J Am Soc Nephrol* **1999**, 10, 822-832.

T

Takahashi M, Shibata M, Niki E. Estimation of lipid peroxidation of live cells using a fluorescent probe, diphenyl-1-pyrenylphosphine. *Free Radic Biol Med* **2001**, 31, 164-174.

Tappel AL. Will antioxidant nutrients slow aging process ? *Geriatrics* **1968**, 23, 97-105.

Taylor SL. Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis. *Lipids* **1976**, 11, 530-538.

Thavasi V, Leong LP, Bettens RPA. Investigation of the influence of hydroxy groups on the radical scavenging ability of polyphenols. *J Phys Chem A* **2006**, 110, 4918-4923.

Thérond P, Blache D. Cibles lipidiques des radicaux libres dérivés de l'oxygène et de l'azote – Effets biologiques des produits d'oxydation du cholestérol et des phospholipides. In : Delattre, J., Beaudeau, J-L., Bonnefont-Rousselot, D. eds. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Paris : *Lavoisier*, **2005**, 45-86.

Thérond P, Bonnefont-Rousselot D. Systèmes antioxydants endogènes. In : Delattre J, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot D. eds. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Paris : *Lavoisier*, **2005**, 45-86.

Thomas JA. Intracellular trapped pH indicators. In : DeWeer P, Salzberg BM. Optical methods in cell physiology. New York : *Wiley Interscience*, **1986**, 311-325.

Tirmenstein MA, Pierce CA, Leraas TL, Fariss MW. A fluorescence plate reader assay for monitoring the susceptibility of biological samples to lipid peroxidation. *Anal Biochem* **1998**, 265, 246-252.

Toppo S, Vanin S, Bosello V, Tosatto SC. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily. *Antioxid Redox Signal* **2008**, *10*, 1501-1514.

Torres de Pinedo A, Peñalver P, Morales JC. Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: Structure–activity relationship. *Food Chem* **2007**, *103*, 55-61.

Trouillas P, Marsal P, Siri D, Lazzaroni R, Duroux J-L. A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetin and taxifolin antioxidants: The specificity of the 3-OH site. *Food Chem* **2006**, *97*, 679-688.

Tsai L, Szweda PA, Vinogradova O, Szweda LI. Structural characterization and immunochemical detection of a fluorophore derived from 4-hydroxy-2-nonenal and lysine. *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**, *95*, 7975-7980.

Tsuchiya M, Kagan VE, Freisleben H-J, Manabe M, Packer L. Antioxidant activity of α -tocopherol, β -carotene, and ubiquinol in membranes : *cis*-parinaric acid-incorporated liposomes. *Methods Enzymol* **1994**, *234*, 371-383.

Tsuchiya M, Asada A, Maeda K, Ueda Y, Sato EF, Shindo M, Inoue M. Propofol versus midazolam regarding their antioxidant activities. *Am J Respir Crit Care Med* **2001**, *163*, 26-31.

Tsuzuki T, Igarashi M, Iwata T, Yamauchi-Sato Y, Yamamoto T, Ogita K, Suzuki T, Miyazawa T. Oxidation rate of conjugated linoleic acid and conjugated linolenic acid is slowed by triacylglycerol esterification and α -tocopherol. *Lipids* **2004**, *39*, 475-480.

Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* **1980**, *191*, 421-427.

U

Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* **2003**, *42*, 318-343.

V

Vaca CE, Wilhem J, Harms-Ringdahl M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mut Res* **1988**, *195*, 137-49.

Vaca CE, Harms-Ringdahl M. Interaction of lipid peroxidation products with nuclear macromolecules. *Biochim Biophys Acta* **1989**, *1001*, 35-43.

Van Acker SABE, Van Den Berg DJ, Tromp MNJL, Griffioen DH, Van Der Vijgh WJF, Bast A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med* **1996 a**, *20*, 331-342.

Van Acker SABE, de Groot MJ, Van Den Berg DJ, Tromp MNJL, Donne-Op den Kelder G, Van Der Vijgh WJF, Bast A. A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. *Chem Res Toxicol* **1996 b**, *9*, 1305-1312.

Van Acker SABE, van Balen GP, van den Berg DJ, Bast A, van der Vijgh WJF. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem Pharmacol* **1998 a**, *56*, 935-943.

Van Acker I, Cillard P, Cillard J. Flavonoid-metal interactions in biological systems. In: Flavonoids in health and disease, Rice-Evans C, Packer L. eds, New York : *Marcel Dekker*, 1998 b, 163-177.

Van Den Berg JJM, Kuypers FA, Qju JH, Chiu D, Lubin B, Roelofsen B, Op Den Kamp JAF. The use of *cis*-parinaric acid to determine lipid peroxidation in human erythrocyte membranes. Comparison of normal and sickle erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta* 1988, 944, 29-39.

Van Der Voort FR, Ismail AA, Sedman, J. The determination of peroxide value oils by Fourier transform infrared spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc* 1994, 71, 921-926.

Van Kujik FJ, Holte LL, Dratz EA. 4-Hydroxyhexenal: a lipid peroxidation product derived from oxidized docosaheptaenoic acid. *Biochim Biophys Acta* 1990, 1043, 116-118.

Vara-Ubol S, Bowers JA. Effect of α -tocopherol, β -carotene, and sodium tripolyphosphate on lipid oxidation of refrigerated, cooked ground turkey and ground pork. *J Food Sci* 2001, 66, 662-667.

Venkatesan P, Rao MNA. Structure-activity relationships for the inhibition of lipid peroxidation and the scavenging of free radicals by synthetic symmetrical curcumin analogues. *J Pharm Pharmacol* 2000, 52, 1123-1128.

Vericel E, Januel C, Carreras M, Moulin P, Lagarde M. Diabetic patients without vascular complications display enhanced basal platelet activation and decrease antioxidant status. *Diabetes* 2004, 53, 1046-1051.

Villaño D, Fernández-Pachón MS, Troncoso AM, García-Parrilla MC. Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Anal Chim Acta* 2005, 538, 391-398.

Villaño D, Fernández-Pachón MS, Moyá ML, Troncoso AM, García-Parrilla MC. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 2007, 71, 230-235.

Von Gadow A, Joubert E, Hansmann CF. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA. *J Agric Food Chem* 1997, 45, 632-638.

Vowells SJ, Sekhsaria S, Malech HL, Shalit M, Fleisher TA. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J Immunol Methods* 1995, 178, 89-97.

W

Wada L, Ou B. Antioxidant activity and phenolic content of oregon caneberries. *J Agric Food Chem* 2002, 50, 3495-3500.

Wallin IE. Symbiontism and the origin of species. Baltimore : *Williams and Wilkins*, 1927, pp. 171.

Wang J, Miyazawa T, Fujimoto K. Inhibition of methyl linoleate peroxidation by maize zein in powder model system at high water activity. *Agric Biol Chem* 1991, 55, 1531-1536.

Wang H, Cao G, Prior RL. Total antioxidant capacity of fruits. *J Agric Food Chem* **1996 a**, *44*, 701 -705.

Wang M, Dhingra K, Hittelman WN, Liehr JG, de Andrade M, Li D. Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissues. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **1996 b**, *5*, 705-710.

Wantanowicz M, Panczenko-Kresowska B, Ziemiński S. The effect of α -tocopherol and ascorbic acid on the serum lipid peroxide level in elderly people. *Ann Nutr Metab* **1984**, *28*, 186-191.

Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med* **2007**, *43*, 995-1022.

Warshall JW, Wampler T. Sources of error in purge and trap analysis of volatile organic compounds. *Am Lab* **1990**, *22*, 38-43.

Wolfenden RS, Willson RL. Radical cation as reference chromogens in kinetic studies of one-electron-transfer reaction: plus radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate). *J Chem Soc Perkin Trans 2* **1982**, 805-812.

Wright JS, Johnson ER, Dilabio GA. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J Am Chem Soc* **2001**, *123*, 1173-1183.

Wu Y, Hamouz F, Schnepf M. Factors affecting static HS-gas chromatographic analysis of lipid oxidation in precooked meat. *J Agric Food Chem* **1998**, *46*, 3677-3682.

X

Xu G, Sayre LM. Structural characterization of a 4-hydroxy-2-alkenal-derived fluorophore that contributes to lipoperoxidation-dependent protein cross-linking in aging and degenerative disease. *Chem Res Toxicol* **1998**, *11*, 247-251.

Y

Yamada S, Kumazawa S, Ishii T, Nakayama T, Itakura K, Shibata N, Kobayashi M, Sakai K, Osawa T, Uchida K. Immunochemical detection of a lipofuscin-like fluorophore derived from malondialdehyde and lysine. *J Lipid Res* **2001**, *42*, 1187-1196.

Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng T-I, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* **1997**, *275*, 1129-1132.

Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **1996**, *93*, 2696-2701.

Yrjönen T, Peiwu L, Summanen J, Hopia A, Vuorela H. Free radical-scavenging activity of phenolics by reversed-phase TLC. *J Am Oil Chem Soc* **2003**, *80*, 9-14.

Zarzuelo A, Duarte J, Jiménez J, González M, Utrilla MP. Vasodilatador effect of olive leaf. *Planta Med* **1991**, 57, 417-419.

Zhu QY, Zhang A, Tsang D, Huang Y, Chen Z-Y. Stability of green tea catechins. *J Agric Food Chem* **1997**, 45, 4624-4628.

Zhu QY, Huang Y, Chen Z-Y. Interaction between flavonoids and α -tocopherol in human low density lipoprotein. *J Nutr Biochem* **2000**, 11, 14-21.

Bases moléculaires de la capacité antioxydante de composés phénoliques : étude en milieux homogène, émulsionné et cellulaire.

De nos jours, un grand nombre d'études suggère qu'en marge des défenses antioxydantes endogènes, les antioxydants alimentaires sont impliqués dans la protection de molécules d'importance biologique contre le stress oxydant. Parmi eux, les composés phénoliques semblent particulièrement prometteurs en raison de leur ubiquité dans le règne végétal. Dans ce contexte, se pose avec acuité la question de leur réelle efficacité et des outils analytiques nécessaires à leur évaluation.

L'un des objectifs de ce travail a été de mieux comprendre les propriétés antioxydantes de ce type de composés, ce qui suppose de disposer de systèmes de tests variés mis en œuvre en milieux homogène, émulsionné et cellulaire. Pour l'étude en système homogène, les méthodes oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL}) et 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ont été choisies, tandis que pour les deux autres types de milieux, de nouvelles méthodologies ont été développées. Concernant les émulsions, nous avons mis au point un test spectrophotométrique appelé test des triènes autoxydables conjugués (CAT), lequel se fonde sur les propriétés d'absorption de l'acide éléostéarique, un acide gras triénoïque conjugué constitutif de l'huile d'*Aleurites fordii* également appelée huile de tung. Concernant les milieux naturels pluri-compartmentés, des lignées cellulaires de fibroblastes caractérisées par une production endogène importante d'espèces oxydantes ont été employées.

Le deuxième objectif a été de caractériser les motifs structuraux impliqués dans le déterminisme de la capacité antioxydante. Pour cela, des composés simples de type acides phénoliques et flavonoïdes purs ou en mélange au sein d'extraits végétaux ont été utilisés. Il a ainsi été constaté que le nombre d'hydroxyles phénoliques pris indépendamment de leur position sur le cycle aromatique n'exerçait aucune influence significative sur la capacité antioxydante. En revanche, il a été démontré que la structure catéchol jouait un rôle majeur dans le déterminisme de la capacité antioxydante pour les méthodes ORAC_{FL} et CAT, mais semblait peu influente sur l'activité antiradicalaire telle que mesurée par la méthode DPPH. En marge de l'étude de composés phénoliques simples, des molécules fonctionnalisées par greffage de chaînes aliphatiques de différentes longueurs sur l'acide 5-caféoylquinique ont également été employées. Il est apparu qu'en systèmes émulsionné et cellulaire, un effet antioxydant maximal a été obtenu pour les esters dodécyliques d'acide 5-caféoylquinique. Ces résultats témoignent de l'influence de la longueur de la chaîne aliphatique dans la modulation de la capacité antioxydante de molécules phénoliques au sein de systèmes hétérogènes impliquant des phases aqueuse et lipidique.

Mots clé : capacité antioxydante, capacité antiradicalaire, composés phénoliques, tests *in vitro*, test des triènes conjugués, 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl, oxygen radical absorbance capacity, cultures cellulaires

Molecular basis of the phenolics antioxidant capacity: study in homogeneous, emulsified and cellular media.

To date, growing evidences suggest that, in addition to organism antioxidant defences, intake of dietary antioxidants may protect important biological molecules from oxidative stress. Among these, phenolics are particularly promising, owing to their ubiquity in the plant kingdom. However, this purpose suggests many crucial questions, regarding the real antioxidant capacity of these compounds, and how to evaluate it.

One of the aims of this work was to obtain a better understanding of the antioxidant properties of such compounds, what supposes to have access to various test systems including homogeneous, emulsified and cellular media. Concerning the study in homogeneous system, oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL}) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods were chosen, whereas for emulsified and cellular systems, specific methodologies were developed. Concerning emulsified media, we developed a new spectrophotometric method called conjugated autoxidizable triene (CAT) assay, which is based on the absorption properties of eleostearic acid, a conjugated trienoic fatty acid found in *Aleurites fordii* seed oil (also called tung oil). For natural pluri-compartmented media, we employed cellular lines of fibroblasts, which are characterized by an important production of endogeneous oxidative species.

The second objective was to characterize structural moieties involved in the antioxidant capacity determinism. For this purpose, simple compounds including pure phenolic acids and flavonoids or plant phenolic extracts have been used. It appeared that the number of phenolic hydroxyl did not exert a significant effect on the antioxidant capacity when it was taken independently to their position on the aromatic ring. On the opposite, it has been noticed that the catechol structure has been mainly involved in the antioxidant capacity determinism for ORAC_{FL} and CAT assays, but seemed to be far less influent on the antiradical capacity as measured by the DPPH method. Besides the study of simple phenolics, functionalized molecules resulting from the esterification of 5-cafeoylquinic acid by various aliphatic alcohols have also been employed. It has been shown in emulsified and cellular systems that a maximal antioxidant effect was obtained for the dodecylic ester. These results underline the influence of the aliphatic chain length on the antioxidant properties of phenolic molecules in heterogeneous systems involving aqueous and lipidic phases.

Key words : antioxidant capacity, antiradical capacity, phenolic compounds, *in vitro* assays, conjugated autoxidizable triene assay, 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl, oxygen radical absorbance capacity, cell cultures
